



Universidade Nova de Lisboa

Lymnaea truncatula em Portugal: contribuição para o estudo da bioecologia e da variação genética.

Pedro Manuel Machado Carlos Ferreira

DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM
CIÊNCIAS BIOMÉDICAS, ESPECIALIDADE DE PARASITOLOGIA

(AGOSTO, 2012)



Universidade Nova de Lisboa

Lymnaea truncatula em Portugal: contribuição para o estudo da bioecologia e da variação genética.

Autor: Pedro Manuel Machado Carlos Ferreira

Licenciado em Análises Clínicas e Saúde Pública

Mestre em Parasitologia Médica

Orientadora: Professora Doutora Maria Amélia Afonso Grácio

Comissão tutorial: Professora Doutora Maria Amélia Afonso Grácio

Professor Doutor Ricardo Parreira

Professora Doutora Manuela Calado

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Maria Amélia Afonso Grácio

(AGOSTO, 2012)

O trabalho foi financiado pelo projecto POCI/CLI/57597/2004, da Fundação para a Ciência e Tecnologia, e pela Unidade de Parasitologia e Microbiologia Médicas (UPMM/FCT)

À Margarida e ao André

À Carla

Aos meus pais e meu irmão

Pelo que fui, pelo que sou e pelo que serei...

Guitarras, atenção, cantai comigo
Calai o vosso pranto, trinaí como vos digo, trinaí
Guitarras, desta vez sem ar magoado
Trinaí este meu canto, que é vosso este meu fado
Guitarras de Lisboa, noite e dia
Trinando nas vielas da cidade
Guitarras que dão voz à Mouraria
E vão falar a sós com a saudade
Guitarras de Lisboa, são meninas
Brincando nas esquinas do passado
Dentro de vós ressoa, a voz do próprio fado
Guitarras de Lisboa, obrigado.

Guitarras, são iguais nossos revezes
Iguais nossos tormentos, são ais nossos lamentos, são ais
Guitarras, mas também quando é preciso
Mostramos muitas vezes que a dor pode ser riso.

(Artur Ribeiro)

Este trabalho foi desenvolvido no **Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), Unidade de Ensino e Investigação em Parasitologia Médica (UEIPM), Grupo de Helminologia e Malacologia Médicas, Unidade de Parasitologia e Microbiologia Médicas (UPMM)**.

O trabalho foi financiado pelo projecto POCI/CLI/57597/2004, da Fundação para a Ciência e Tecnologia, e pela Unidade de Parasitologia e Microbiologia Médicas (UPMM).

À **Professora Doutora Maria Amélia Afonso Grácio**, Professora Catedrática jubilada do IHMT, pela orientação e supervisão deste trabalho, assim como todo o apoio e ensinamentos que me transmitiu durante todo este tempo. Gostaria ainda de agradecer a possibilidade que me deu de poder trabalhar em investigação, assim como toda a amizade demonstradas ao longo de todo este tempo que temos trabalhado juntos.

À **Professora Doutora Silvana Belo**, Directora da UEIPM e do grupo de Helminologia e Malacologia Médicas, por toda a amizade disponibilidade e espírito crítico sempre demonstrado enquanto colega e actualmente como directora da Unidade.

Ao **Professor Doutor Ricardo Parreira**, membro da minha comissão tutorial, Agradeço-lhe todo o apoio prestado e a disponibilidade que demonstrou ao longo deste tempo, que mesmo estando muito ocupado, quando dele precisei, a resposta foi sempre: sim.

À **Professora Doutora Manuela Calado**, membro da minha comissão tutorial, agradeço-lhe, além da amizade, por tudo o que me ensinou nos trabalhos de campo malacológicos quando ambos colhíamos material para as respectivas teses, bem como na biologia molecular dos moluscos.

À **Professora Doutora Luzia Gonçalves**, por todo o apoio prestado na análise estatística dos resultados.

À **Professora Doutora Isabel Maurício**, pela ajuda com os estudos filogenéticos.

À **Investigadora Doutora Ana Afonso**, com quem tenho o prazer de partilhar o gabinete, por todo o apoio prestado durante esta fase final do trabalho, quer na parte técnica quer na revisão crítica. Pelo companheirismo, pela ajuda, e sobretudo por demonstrar que com trabalho e interesse tudo é possível, o meu muito obrigado.

À **Mestre Cátia Ferreira**, por toda a ajuda quer no trabalho de campo quer no trabalho laboratorial, assim como pela amizade durante estes anos.

Ao **Dr. Tiago Mendes**, agradeço-lhe pela amizade e ajuda que me dispensou durante este último ano em que temos trabalhado juntos. É o colega que todos desejariam ter.

À **Doutora Elsa Casimiro** e ao **Dr Pedro Garrett** pelo apoio teórico para a colheita de dados de campo.

À **Técnica Especialista Maria Isabel Clemente**, agradeço-lhe além da amizade, todo o apoio que me tem prestado, nomeadamente a disponibilidade que tantas vezes demonstrou a me auxiliar nas minhas tarefas profissionais, aquando da escrita da tese.

Ao **Mestre António Pinto**, pela cedência de moluscos *Lymnaea natalensis* utilizados neste estudo.

À **Mestre Sílvia Beato** e à **Mestre Jacinta Figueiredo** pelo companheirismo, ao longo destes anos.

À **Dra Teresa Pacheco**, pela amizade e espírito que me incutiu desde o dia que iniciei a minha actividade profissional.

À **Dra Maria do Rosário Lobo**, pela amizade e incentivo no estudo da parasitologia.

A todos **Mestres** que fui encontrando ao longo da vida, que de uma forma ou de outra, contribuíram para a minha formação.

Aos meus **Pais** e ao meu **Irmão**, porque grande parte daquilo que sou hoje, a eles o devo, através dos exemplos que me deram e valores que me transmitiram ao longo da vida.

À **Carla**, minha mulher, por todo o amor, tranquilidade e confiança. Só assim foi possível abraçar um projecto desta natureza.

À **Margarida** e ao **André**, por fazerem tudo valer a pena.

À minha **Guitarra**, por ser o ponto de equilíbrio da minha vida. É ela que me faz esquecer o mundo, como se de uma pessoa se tratasse.

Resumo

Lymnaea truncatula em Portugal: contribuição para o estudo da bioecologia e da variação genética.

Pedro Ferreira

Palavras-Chave: *Lymnaea truncatula*, *Fasciola hepatica*, *Lymnaea schirazensis*, *Pseudosuccinia columella*, bioecologia, diversidade genética

Lymnaea truncatula é um gastrópode de água doce com importância em medicina por ser hospedeiro intermediário do tremátode parasita *Fasciola hepatica*. É o único hospedeiro intermediário desta espécie encontrado até agora em Portugal.

A fasciolose é responsável por perdas de produtividade em gado. Nos humanos, é uma parasitose emergente com relevo em saúde pública em várias regiões do globo. Portugal é o segundo país europeu com maior prevalência.

L. truncatula é de difícil controlo por ser anfíbia e ter boa capacidade de sobrevivência e adaptação.

A eficácia dos programas de controlo e monitorização depende da correcta identificação das espécies de hospedeiros intermediários, dado que nem todas as espécies apresentam a mesma sensibilidade à infecção por *F. hepatica*. A morfologia da concha e a anatomia dos órgãos são insuficientes na identificação das espécies, sendo necessário usar técnicas de biologia molecular.

Os objectivos deste estudo foram: estudar a distribuição, a variação da densidade populacional ao longo do ano, a diversidade genética, os habitats e a influência de parâmetros físicos, químicos e biológicos, na densidade populacional de *L. truncatula* em cinco distritos portugueses (Coimbra, Évora, Leiria, Lisboa e Funchal).

Realizaram-se inquéritos malacológicos bimestrais durante 2 anos, entre Janeiro de 2006 e Dezembro de 2007 em Portugal continental e dois (Julho e Novembro de 2009) na ilha da Madeira. No continente, encontrou-se *L. truncatula* em: ribeiros temporários, com pouca vegetação, substrato de argila e matéria em decomposição e com água límpida, incolor e inodora, e com concentração de cálcio e de sulfatos até 50 mg/l e 267mg/l, respectivamente. A presença de outras espécies de moluscos, como *Planorbarius metidjensis*, *Lymnaea peregra* e da subclasse Prosobronchiata, assim como concentrações elevadas de nitratos, estão associados a uma menor densidade populacional.

Na ilha da Madeira, os habitats foram predominantemente: escorrimentos de encosta, permanentes, com fraca exposição solar, pouca vegetação, substrato de rocha, argila e matéria em decomposição e com água límpida, incolor e inodora, acima dos 14,4°C. A densidade populacional diminui com o aumento dos valores de nitratos e aumenta com a concentração de cálcio na água.

As fezes de animais presentes junto às coleções de água não apresentaram ovos de *F. hepatica*. Foi encontrado um exemplar de *F. hepatica* no fígado de um gamo da Tapada Nacional de Mafra (distrito de Lisboa)

Estudou-se a diversidade genética de *L. truncatula* através de RAPD-PCR e sequenciação do gene ribossomal *18S* e da região *ITS-2* (este também por PCR-RFLP). Identificou-se pela primeira vez em Portugal continental e na ilha da Madeira uma espécie, geneticamente diferente mas morfológicamente muito semelhante a *L. truncatula* – *Lymnaea schirazensis*. Na ilha da Madeira, foi detectado um haplotipo distinto do presente no continente. O marcador de RAPD - OPA2 e PCR-RFLP com *HpaII*, são bons marcadores para distinção entre *L. truncatula* e *L. schirazensis*.

Adicionalmente, detectou-se pela primeira vez na ilha da Madeira *L. (Pseudosuccinea) columella*, conhecido hospedeiro intermediário de *F. hepatica*. Este estudo permitiu melhorar o conhecimento sobre hospedeiros intermediários de *F. hepatica* em Portugal, o que poderá melhorar o controlo e monitorização da fasciolose.

Abstract

Lymnaea truncatula in Portugal: contribution for the study of
bioecology and genetic variation

Pedro Ferreira

Keywords: *Lymnaea truncatula*, *Fasciola hepatica*, *Lymnaea schirazensis*, *Pseudosuccinia columella*, bioecology, genetic diversity

Lymnaea truncatula is a freshwater snail with medical and veterinary interest, due to its role as an intermediate host of the liver fluke *Fasciola hepatica*, and the only one found in Portugal.

The productivity losses are the main effects of fascioliasis in animals. In humans, fascioliasis is an important emerging disease, from the public health view, in several regions. Portugal is the second most prevalent country in Europe. The *L. truncatula* control programs are difficult due to this snail amphibian characteristic, the survival capacity and adaptation to the environmental conditions. The efficiency of these control and monitoring programs depends on the correct identification of the snail intermediate hosts species, due to the different susceptibility rates to *F. hepatica* infection. The shell morphology and tissue anatomy are not sufficient to the species taxonomic identification, therefore the use of molecular tools is necessary. The objectives of this study were: to study the distribution and population density of *L. truncatula* throughout the year; the genetic diversity, habitats and the influence of the physical, physico-chemical and biological parameters, on the population density of *L. truncatula* in five Portuguese districts (Coimbra, Évora, Leiria, Lisbon and Funchal).

Malacological surveys were performed every two months for two years, between January 2006 and December 2007, in mainland Portugal and two surveys (July and November 2009) in Madeira island. In the mainland *L. truncatula* was found in temporary small rivers, with low vegetation, mud and decomposing organic matter substratum, with clear water. The suitable calcium and sulfate concentrations were up to 50 mg/l and 267mg/l respectively. Other freshwater snails species like *Planorbis metidjensis*, *Lymnaea peregra* and Prosobranchiata sub-class, as well as higher nitrate concentrations seem to be associated with a lower *L. truncatula* population density.

In Madeira island, the habitats were mainly permanent runoff slopes, with low sun exposure, low vegetation, rocks, mud and decomposing organic matter substratum, with clear water over 14,4°C. The population density decreased with the increase of nitrate levels in water.

There were not found *F. hepatica* eggs in animal faeces, near the water courses. One *F. hepatica* parasite was recovered from a liver of a deer from Tapada Nacional de Mafra (Lisbon district)

Genetic diversity of *L. truncatula* was studied through RAPD-PCR, ribosome 18S and ITS-2 sequencing and PCR-RFLP applied to the ITS-2 region.

For the first time, in Portugal (mainland and Madeira island), it was identified a genetically different species, with morphological similarities to *L. truncatula* – *Lymnaea schirazensis*. In Madeira island, a distinct haplotype of this species was found. The RAPD-PCR - OPA2 marker and PCR-RFLP (with *HpaII* enzyme), showed to be suitable markers for differentiation between *L. truncatula* and *L. schirazensis*.

Furthermore, it was detected, for the first time, the snail *L. (Pseudosuccinea) columella*, in Madeira island, a natural intermediate host of *F. hepatica* in several regions. This study allowed us to improve the knowledge of *F. hepatica* intermediate hosts in Portugal, which will allow a better control and monitoring of fascioliasis.

Índice

	Página
Agradecimentos	vii
Resumo	ix
Abstract	xi
Índice	xiii
Índice de figuras	xix
Índice de tabelas	xxiii
Lista de abreviaturas	xxvii
Introdução	1
1. A fasciolose	2
1.1. Considerações gerais	2
1.2. A patologia da fasciolose	3
1.3. Fasciolose humana no mundo	4
1.4. Fasciolose em Portugal	5
1.4.1. Continente	5
1.4.2. Madeira	6
2. O Parasita - <i>Fasciola hepatica</i> Linneaus, 1758	7
2.1. Sistemática	8
2.2. Ciclo de vida	9
3. Hospedeiros intermediários - <i>Lymnaea truncatula</i> Muller, 1774	11
3.1. Considerações gerais	11
3.2. Sistemática	12
3.3. Aspectos morfológicos	12
Objectivos	15

Lymnaea truncatula em Portugal: contribuição para o estudo da bioecologia e da variação genética.

4. Resultados	32
4.1. Bioecologia de <i>L. truncatula</i> nos distritos de Coimbra, Évora, Leiria e Lisboa	32
4.1.1. Estudo dos potenciais habitats de moluscos	32
4.1.1.1. Descrição dos locais estudados	33
4.1.1.2. Doseamentos efectuados nas águas dos locais estudados	39
4.1.1.3. Moluscos colhidos	43
4.1.2. Caracterização dos habitats preferenciais de <i>L. truncatula</i>	45
4.1.3. Influência dos parâmetros físicos, físico-químicos e biológicos dos habitats na densidade populacional de <i>L. truncatula</i>	52
4.1.3.a. Parâmetros físicos	52
4.1.3.b. Parâmetros físico-químicos	52
4.1.3.c. Parâmetros biológicos	54
4.2. Bioecologia de <i>L. truncatula</i> na Ilha da Madeira	55
4.2.1. Descrição dos locais estudados e caracterização dos habitats preferenciais de <i>L. truncatula</i>	55
4.2.1.1. Moluscos colhidos	58
4.2.1.2. Doseamentos efectuados nas águas dos locais estudados	60
4.2.2. Influência dos parâmetros físicos, físico-químicos e biológicos na densidade de <i>L. truncatula</i> na ilha da Madeira	63
4.2.2.a. Parâmetros físicos	63
4.2.2.b. Parâmetros físico-químicos	63
4.2.2.c. Parâmetros biológicos	64
4.3. Presença de <i>F. hepatica</i>	65
4.3.1. Pesquisa da eliminação de cercarias	65
4.3.2. Pesquisa de DNA de <i>F. hepatica</i> nos moluscos	65
4.4. Pesquisa de ovos de <i>F. hepatica</i> nas fezes de animais	65
4.5. Pesquisa de parasitas adultos <i>F. hepatica</i> em figados de animais	65
5. Discussão	66
6. Conclusões	76

Capítulo II. Caracterização genética dos moluscos *L. truncatula*

1. Introdução	80
1.1. Considerações gerais	80
1.2. Amplificação e sequenciação de DNA	80
1.2.1. Amplificação e sequenciação do gene <i>18S</i> do <i>rDNA</i>	80
1.2.2. Amplificação e sequenciação da região <i>ITS-2</i> do <i>rDNA</i> ...	81
1.3. PCR-RFLP – “ <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> ”	82
1.4. RAPD – PCR - “ <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> ”	82
2. Objectivos	84
3. Material e Métodos	85
3.1. Extracção de DNA	85
3.2. Amplificação de DNA	86
3.2.1. Amplificação do gene <i>18S</i> do <i>rDNA</i>	86
3.2.2. Amplificação região <i>ITS-2</i> do <i>rDNA</i>	88
3.2.2.1. PCR - RFLP aplicada à região <i>ITS-2</i> do <i>rDNA</i>	88
3.3. Purificação e sequenciação do DNA amplificado	89
3.3.1. Purificação do DNA	89
3.3.2. Sequenciação	89
3.3.3. Análise filogenética	90
3.3.3.a. Análise do gene <i>18S</i>	91
3.3.3.b. Análise da região <i>ITS-2</i>	92
3.4. RAPD - PCR	92
4. Resultados	94
4.1. Estudo do gene ribossomal <i>18S</i>	94
4.1.1. Amplificação e sequenciação	94
4.1.2. Análise filogenética	96
4.2. Estudo da região <i>ITS-2</i> do <i>rDNA</i>	98
4.2.1. Amplificação do DNA	98
4.2.2. PCR - RFLP	99
4.2.3. Sequenciação	100
4.2.4. Análise filogenética	102

4.3. RAPD - PCR	104
5. Discussão	106
6. Conclusões	114
Capítulo III. Potenciais hospedeiros intermediários de <i>Fasciola</i> sp- <i>Lymnaea columella</i> na Ilha da Madeira – Primeiro registo	
1. Introdução	116
2. Objectivos	116
3. Material e métodos	116
3.1. Moluscos	116
3.2. Análise morfológica	116
3.3. Análise molecular	117
3.3.1. Extração de DNA	117
3.3.2. Amplificação de gene <i>I6S</i> do DNA mitocondrial (<i>mtDNA</i>)	117
3.3.3. Amplificação do gene <i>Citocromo Oxidase I</i> (<i>COI</i>) do <i>mtDNA</i>	117
3.3.4. Purificação e sequenciação	118
3.3.5. Análise filogenética	119
4. Resultados	120
4.1. Inquérito malacológico	120
4.2. Análise morfológica	121
4.3. Amplificação e sequenciação dos genes <i>I6S</i> e <i>COI</i> do <i>mtDNA</i>	122
5. Discussão	125
6. Conclusões	127
Conclusões gerais	129
Bibliografia	133

Anexos

Anexo 1	Ficha de campo	154
Anexo 2	Protocolo de purificação de DNA	157
Anexo 3	Sequências nucleotídicas do gene <i>18S</i> do <i>rDNA</i>	158
Anexo 4	Sequências nucleotídicas da região <i>ITS-2</i> do <i>rDNA</i>	169
Anexo 5	Sequências nucleotídicas do gene <i>16S</i> do <i>mtDNA</i>	169
Anexo 6	Sequências nucleotídicas do gene <i>COI</i> do <i>mtDNA</i>	170
Anexo 7	Modelos de substituição para Análise filogenética do gene <i>18S</i> do <i>rDNA</i>	172
Anexo 8	Modelos de substituição para Análise filogenética da região <i>ITS-2</i> do <i>rDNA</i>	173
Anexo 9	Modelos de substituição para Análise filogenética do gene <i>16S</i> do <i>mtDNA</i>	174
Anexo 10	Modelos de substituição para Análise filogenética do gene <i>COI</i> do <i>mtDNA</i>	175

Índice de Figuras

	Página
Figura 1. Regiões onde fasciolose é endémica	5
Figura 2. Morfologia de <i>F. hepatica</i>	8
Figura 3. Ovo de <i>F. hepatica</i>	8
Figura 4. Ciclo de vida de <i>F. hepatica</i>	9
Figura 5. Morfologia da concha de <i>L. truncatula</i>	13
Figura 6. Caracteres anatómicos do aparelho reprodutor de <i>L. truncatula</i> de Limoges, França	13
Figura 7. Fezes de animais junto às colecções de água	26
Figura 8. Mapa de Portugal continental com indicação dos distritos onde se realizaram estudos.....	32
Figura 9. Colecções de água estudadas no distrito de Coimbra	34
Figura 10. Colecções de água estudadas no distrito de Évora	35
Figura 11. Colecções de água estudadas no distrito de Leiria	36
Figura 12. Colecções de água estudadas no distrito de Lisboa	36
Figura 13. Valor de pH da água, média por distrito	39
Figura 14. Valor de pH da água, média dos 4 distritos estudados	39
Figura 15. Temperatura da água, média por distrito	40
Figura 16. Temperatura da água, média dos 4 distritos estudados	40
Figura 17. DT da água, média por distrito	40
Figura 18. DT da água, média dos 4 distritos estudados	40
Figura 19. DC da água, média por distrito estudados	41
Figura 20. DC da água, média dos 4 distritos estudados	41
Figura 21. Concentração de nitratos na água, média por distrito	41

Figura 22.	Concentração de nitratos na água, média dos 4 distritos estudados	41
Figura 23.	Concentração de sulfatos na água, média por distrito	42
Figura 24.	Concentração de sulfatos na água, média dos 4 distritos estudados	42
Figura 25.	Concentração de cálcio na água, média por distrito	42
Figura 26.	Concentração de cálcio na água, média dos 4 distritos estudados	42
Figura 27.	Número de moluscos <i>L. truncatula</i> colhidos por distrito	43
Figura 28.	Tipo de localização dos moluscos <i>L. truncatula</i> nos seus habitats, em Portugal continental	45
Figura 29.	DT da água dos habitats com <i>L. truncatula</i>	50
Figura 30.	DC da água dos habitats com <i>L. truncatula</i>	50
Figura 31.	pH da água dos habitats com <i>L. truncatula</i>	50
Figura 32.	Temperatura da água dos habitats com <i>L. truncatula</i>	50
Figura 33.	Concentração de nitratos na água dos habitats com <i>L. truncatula</i>	51
Figura 34.	Concentração de sulfatos na água dos habitats com <i>L. truncatula</i>	51
Figura 35.	Concentração de cálcio na água dos habitats com <i>L. truncatula</i>	51
Figura 36.	Variação do número de moluscos <i>L. truncatula</i> colhidos em relação às concentrações de DT na água	53
Figura 37.	Variação do número de moluscos <i>L. truncatula</i> colhidos em relação às concentrações de nitratos na água	53
Figura 38.	Variação do número de moluscos <i>L. truncatula</i> colhidos em relação às concentrações de sulfatos na água	54
Figura 39.	Variação do número de moluscos <i>L. truncatula</i> colhidos em relação às concentrações de cálcio na água	54

Figura 40.	Mapa da ilha da Madeira evidenciando os locais de colheita de moluscos	55
Figura 41.	Tipo de colecções de água estudadas na ilha da Madeira	56
Figura 42.	Tipo de localização dos moluscos <i>L. truncatula</i> nos seus habitats, na Ilha da Madeira	59
Figura 43.	Número de moluscos colhidos na ilha da Madeira, em Julho e Novembro	60
Figura 44.	Variação dos moluscos <i>L. truncatula</i> colhidos em relação à concentração de cálcio	64
Figura 45.	Variação dos moluscos <i>L. truncatula</i> colhidos em relação à concentração de nitratos	64
Figura 46.	Fragmento de DNA amplificado, na pesquisa de <i>F. hepatica</i> , nos moluscos <i>Lymnaea</i> sp	65
Figura 47.	Esquema do gene <i>rRNA</i> (<i>rDNA</i>)	81
Figura 48.	Esquema do gene <i>18S</i> , evidenciando os fragmentos amplificados com os vários pares de SeqIn	87
Figura 49.	Resultado obtido após amplificação do gene <i>18S</i> do <i>rDNA</i> com 5 pares diferentes de SeqIn	94
Figura 50.	Análise filogenética do gene <i>18S</i> do <i>rDNA</i> , pelo método da máxima verosimilhança	97
Figura 51.	Análise filogenética do gene <i>18S</i> do <i>rDNA</i> , por análise Bayesiana	98
Figura 52.	Produtos da amplificação da região <i>ITS-2</i> do <i>rDNA</i>	99
Figura 53.	Perfil de restrição obtido após amplificação da região <i>ITS-2</i> e digestão com enzima <i>HpaII</i>	99

Figura 54.	Análise filogenética da região <i>ITS-2</i> do <i>rDNA</i> , pelo método da máxima verosimilhança	103
Figura 55.	Análise filogenética da região <i>ITS-2</i> do <i>rDNA</i> , por análise Bayesiana	104
Figura 56.	Perfil de RAPD – PCR obtido com o marcador OPA2	105
Figura 57.	Mapa de Portugal continental, com indicação dos locais onde se colheram moluscos <i>L. schirazensis</i>	111
Figura 58.	Mapa da ilha da Madeira com indicação dos locais estudados e onde se colheram moluscos da espécie <i>L. schirazensis</i>	112
Figura 59.	Mapa da ilha da Madeira: Localização dos habitats estudados e Habitats com <i>Lymnaea</i> sp	120
Figura 60.	Habitats de <i>Lymnaea</i> sp	120
Figura 61.	Moluscos <i>Lymnaea</i> sp fixos às plantas to habitat	121
Figura 62.	Morfologia da concha de <i>Lymnaea</i> sp	121
Figura 63.	Morfologia da rádula de <i>Lymnaea</i> sp	122
Figura 64.	Resultados da amplificação dos genes <i>16S</i> (a) e <i>COI</i> (b)	122
Figura 65.	Análise filogenética do gene <i>16S</i> do <i>mtDNA</i> , pelo método da máxima verosimilhança	123
Figura 66.	Análise filogenética do gene <i>COI</i> do <i>mtDNA</i> , pelo método da máxima verosimilhança	124

Índice de Tabelas

	Página
Tabela 1. Espécies de hospedeiros intermediários de <i>F. hepatica</i> dentro do género <i>Lymnaea</i> , consoante a região do globo	11
Tabela 2. Carácter das colecções de água nos 4 distritos estudados	33
Tabela 3. Tipos de colecções de água encontradas nos 4 distritos estudados.	33
Tabela 4. Carácter da vegetação existente nas colecções de água nos 4 distritos estudados	37
Tabela 5. Tipo de vegetação presente na água	37
Tabela 6. Tipo de substrato nas colecções de água	38
Tabela 7. Quantidade de vegetação na margem das colecções de água	38
Tabela 8. Presença de agriões dentro das colecções de água	39
Tabela 9. Tipo de exposição solar nas colecções de água	39
Tabela 10. Moluscos colhidos por distrito	44
Tabela 11. Tipos de colecções de água estudados, com presença de <i>L. truncatula</i>	46
Tabela 12. Carácter das colecções de água estudadas, com presença de <i>L. truncatula</i>	46
Tabela 13. Vegetação na água dos habitats estudados, com presença de <i>L. truncatula</i>	46
Tabela 14. Tipo de vegetação na água dos habitats estudados, com presença de <i>L. truncatula</i>	47
Tabela 15. Tipo de substrato dos habitats estudados, com presença de <i>L. truncatula</i>	47
Tabela 16. Quantidade de vegetação na margem dos habitats estudados, com presença de <i>L. truncatula</i>	48

Tabela 17.	Presença de agriões dentro das colecções de água estudadas, com presença de <i>L. truncatula</i>	48
Tabela 18.	Limpidez da água dos habitats estudados, com presença de <i>L. truncatula</i>	48
Tabela 19.	Cor da água dos habitats estudados, com presença de <i>L. truncatula</i>	49
Tabela 20.	Cheiro da água dos habitats estudados, com presença de <i>L. truncatula</i>	49
Tabela 21.	Tipo de exposição solar nas colecções de água estudadas, com presença de <i>L. truncatula</i>	49
Tabela 22.	Teste de Kruskal-Wallis	52
Tabela 23.	Teste de correlação de Spearman	52
Tabela 24.	Teste de Kruskal-Wallis	53
Tabela 25.	Teste de correlação de Spearman	54
Tabela 26.	Tipos de habitat prospectados na ilha da Madeira	57
Tabela 27.	Carácter da vegetação aquática, na ilha da Madeira	57
Tabela 28.	Quantidade de vegetação na margem das colecções de água, na ilha da Madeira	57
Tabela 29.	Tipo de vegetação na água, na ilha da Madeira	58
Tabela 30.	Tipo de substrato na água, na ilha da Madeira	58
Tabela 31.	Moluscos colhidos na ilha da Madeira	59
Tabela 32.	Valores de pH da água dos habitats estudados, na ilha da Madeira	60
Tabela 33.	Valores de temperatura da água dos habitats estudados, na ilha da Madeira	61
Tabela 34.	DT na água dos habitats estudados, na ilha da Madeira	61
Tabela 35.	DC na água dos habitats estudados, na ilha da Madeira	61

Tabela 36.	Concentração de cálcio na água dos habitats estudados, na ilha da Madeira	62
Tabela 37.	Concentração de nitratos na água dos habitats estudados, na ilha da Madeira	62
Tabela 38.	Teste de Kruskal-Wallis	63
Tabela 39.	Teste de correlação de Spearman	63
Tabela 40.	Teste de Kruskal-Wallis	64
Tabela 41.	Teste de correlação de Spearman	64
Tabela 42.	SeqIn selecionadas para amplificação do gene <i>18S</i>	87
Tabela 43.	SeqIn usadas para análise RAPD-PCR	92
Tabela 44.	Pesos moleculares dos fragmentos amplificados do gene <i>18S</i> ...	94
Tabela 45.	Composição nucleotídica das sequências do gene <i>18S</i> do <i>rDNA</i>	95
Tabela 46.	Diferenças nucleotídicas na sequência do gene <i>18S</i> do <i>rDNA</i> , referentes aos vários perfis nucleotídicos observados	95
Tabela 47.	Perfis nucleotídicos encontrados e respectivos haplotipos, por habitat estudado	96
Tabela 48.	Perfis de restrição obtidos e respectivos habitats de proveniência dos moluscos	100
Tabela 49.	Composição nucleotídica das sequências da região <i>ITS-2</i> do <i>rDNA</i>	100
Tabela 50.	Diferenças nucleotídicas na sequência da região <i>ITS-2</i> do <i>rDNA</i> , referentes aos vários perfis nucleotídicos observados	101
Tabela 51.	Perfis nucleotídicos da sequência da região <i>ITS-2</i> do <i>rDNA</i> , e respectivos haplotipos por habitat	102
Tabela 52.	Perfis de RAPD – PCR obtidos e respectivos habitats de proveniência dos moluscos	105

Lista de abreviaturas

Sigla	Significado
AR	Areia
ARG	Argila
BLAST	<i>Basic Local Aligment Search Tool</i>
CCA	Campo de cultivo de arroz
CIM	Cimento
CTAB	Cetyltrimethylammonium Bromide
DC	Dureza carbonatada
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DT	Dureza total
EDTA	Ácido Etileno-Diamino-Tetra-Acético
EENC	Escorrimento de encosta
EMG	Emergente
EUA	Estados Unidos da América
FCT	Fundação para a Ciência e Tecnologia
FLUT	Flutuante
GPS	<i>Geographic Positioning System</i>
Hd	Diversidade haplotípica
HUM	Húmus
IHMT	Instituto de Higiene e Medicina Tropical
IMS	Imersa

Sigla	Significado
IPCC	<i>Intergovernmental Panel on Climate Change</i>
ITS1/ITS2	<i>Internal Transcribed Spacers 1/2</i>
MDEC	Matéria em decomposição
Min	Minutos
ML	Máxima Verosimilhança
<i>mtDNA</i>	DNA mitocondrial
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
π	Diversidade genética
PCA	Pequeno caudal de água
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PCR-RFLP	<i>Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
<i>rDNA</i>	DNA ribossomal
RAPD-PCR	<i>Random Amplified Polymorphic DNA -Polymerase Chain Reaction</i>
ρ	Coeficiente de correlação de Spearman
Seg	Segundos
SeqIn	Sequências Iniciadoras
SO_4^{2-}	Ião sulfato
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TE	Tris-EDTA
TNM	Tapada Nacional de Mafra
UEI	Unidade de Ensino e Investigação
UPMM	Unidade de Parasitologia e Microbiologia Médicas

Introdução



1. A Fasciolose

1.1 Considerações gerais

A fasciolose, zoonose causada por helmintas do género *Fasciola* (Trematoda, Fasciolidae) tem assumido, ao longo dos anos uma elevada importância no contexto da saúde pública. As duas espécies responsáveis pela doença são *Fasciola gigantica* Cibbold, 1856, e *Fasciola hepatica* Linneaus, 1758. No entanto, esta última é a única espécie que tem sido assinalada em Portugal.

F. hepatica pode ter como hospedeiros definitivos uma grande variedade de mamíferos, incluindo os humanos. Os animais mais afectados por este parasitismo são, principalmente, bovinos, ovinos e caprinos, nos quais ocorrem perdas de produtividade, com elevadas repercussões económicas (Dalton, 1999, Valero *et al.*, 2003).

Apesar dos estudos epidemiológicos efectuados no passado, relativamente ao parasita e aos seus hospedeiros intermediários e dos alertas para a importância desta parasitose (Grácio, 1992, Rombert & Grácio, 1984), o número de casos de fasciolose em Portugal continua a ser dos mais elevados da Europa (Mas-Coma *et al.*, 1999).

O carácter emergente/reemergente desta parasitose está ligado a uma série de alterações ambientais sejam elas naturais, como as climáticas, ou provocadas pelos humanos, como a construção de barragens e de cursos de água, que favorecem a disseminação dos seus hospedeiros intermediários (Mas-Coma *et al.*, 1999, WHO, 1995).

Ao contrário da fasciolose humana, a fasciolose animal tem sido bem caracterizada e estudada ao longo de várias décadas, nomeadamente no que se refere a perdas económicas a ela associada (Tostes *et al.*, 2004, Conceição *et al.*, 2004), ao esclarecimento do ciclo de vida do parasita e tamanho do mesmo. Assim, com base na origem do hospedeiro definitivo, na comparação de estudos de infectividade, na longevidade, na eclosão dos ovos e na imunidade, *F. hepatica* parece estar melhor adaptada aos ovinos, apesar de infectar muitos outros animais. No entanto, as evidências mostram que *F. gigantica*, parece estar melhor adaptada aos bovinos (Mas-Coma *et al.*, 2009).

Nos humanos o conhecimento resume-se a relatos esporádicos em regiões endémicas da doença animal em países desenvolvidos, o que vem contribuindo para que esta doença seja considerada negligenciada (Mas-Coma *et al.*, 2009).

No passado, a fasciolose parecia estar limitada a áreas geográficas específicas. Contudo, actualmente a doença encontra-se espalhada por, praticamente, todo o globo, com casos humanos a serem reportados sucessivamente. *F. hepatica* é a única espécie existente na Europa, Américas e Oceânia, enquanto *F. gigantica* apenas está descrita em África e Ásia. Ambas as espécies coexistem em vários países Africanos e Asiáticos. Actualmente, a fasciolose por *F. hepatica* é a parasitose, de entre as transmitidas através dos alimentos e envolvendo um hospedeiro intermediário, com a distribuição mais ampla quer em latitude, longitude e altitude, devido aos mais recentes relatos da doença no Altiplano do Norte da Bolívia (WHO, 2007, Mas-Coma *et al.*, 2009). Este facto demonstra a elevada capacidade de adaptação quer do parasita quer do seu hospedeiro intermediário a diferentes condições ambientais.

1.2. A patologia da fasciolose

Os sintomas da fasciolose são vários e dependem da fase de infecção. A fase aguda da doença ocorre desde o desenquistamento das metacercárias até ao estabelecimento dos parasitas adultos nos canais biliares. Nesta fase há destruição do tecido parenquimatoso, e consequente hemorragia, causada pela migração do parasita. Os sinais clínicos passam por hepatomegalia, esplenomegalia, anemia (em geral, moderada), fraqueza e eosinofilia que pode atingir os 80%.

A fase crónica ocorre quando os parasitas já se encontram nos ductos biliares. É possível observar-se colangite, colecistite e urticária devido à reacção inflamatória, icterícia devido à obstrução dos ductos biliares pelos próprios parasitas. Com isto pode surgir dor abdominal, náuseas, reacções de hipersensibilidade e intolerância às gorduras alimentares (Cook and Zumla, 2003). A reacção inflamatória surge devido, para além dos factores já mencionados, à reacção à prolina. A prolina é uma substância excretada pelo parasita em grandes quantidades, que facilita a sua movimentação pelos ductos (Campbell *et al.*, 1981).

Podemos ainda observar lesões ectópicas em vários tecidos, como nódulos ou granulomas que são muitas vezes diagnosticados, erradamente, como tumores malignos ou úlceras gástricas. Isto resulta dos parasitas que durante a sua fase de migração não conseguem atingir os ductos biliares. Por outro lado, em alguns casos a infecção subclínica provoca sintomas muito discretos e facilmente confundíveis com outras parasitoses.

O grau de morbilidade causada, tanto nos humanos como nos animais, depende do número de metacercárias ingeridas e, conseqüentemente, do número de parasitas adultos nos canais biliares.

1.3. Fasciolose humana no mundo

A fasciolose humana foi considerada, desde o passado, uma doença secundária, devido ao reduzido número de casos. No entanto, o panorama da doença tem vindo a alterar-se, com o aumento de casos diagnosticados nos últimos anos. Entre 1970 e 1990 detectaram-se 2594 infectados em 42 países. Nos últimos 25 anos mais relatos se sucederam, chegando aos 7071 casos de fasciolose humana em 51 países, distribuídos pelos 5 continentes: África (487), América (3267), Ásia (354), Oceânia (12) e Europa (2951). No entanto, o número real de casos é, certamente, superior do que o reportado (Mas-Coma, 2004, Esteban *et al.*, 1998) (Figura 1). Em Cabo Verde ocorre fasciolose humana por *F. gigantica* (Grácio, 1999).

A fasciolose humana é uma problemática de relevo em saúde pública no Altiplano da Bolívia (Esteban *et al.*, 1997, Angles *et al.*, 1997, Esteban *et al.*, 1999), terras altas do Peru e Equador, Delta do Nilo no Egipto (Curtale *et al.*, 2003, Haseeb *et al.*, 2002) e, região do Mar Cáspio, no Irão, onde um surto em 1991 infectou mais de 10 000 pessoas (WHO, 1995, Soliman, 2008, Karimi *et al.*, 2004).

É de salientar o papel que outros hospedeiros, denominados hospedeiros secundários ou reservatórios, desempenham na manutenção de focos de transmissão da fasciolose em várias regiões do globo, como é o caso dos roedores na ilha mediterrânica da Córsega (Valero *et al.*, 1998), ou até mesmo o porco e o burro no Altiplano da Bolívia (Mas-Coma *et al.*, 1997, Bargues *et al.*, 2011b).

O hábito de consumo de agriões (*Nasturtium officinale*) crus, em saladas, que faz parte dos hábitos alimentares da população, em várias regiões, são a principal fonte de infecção humana (Mas-Coma & Bargues, 1997). Na Argélia ocorreu um surto de fasciolose em emigrantes do sul da Europa, durante a ocupação francesa. No entanto, isso não se verificou nos nativos, pelo facto de não terem esse hábito alimentar. O consumo de agriões selvagens representa um risco acrescido, pois não há condições de cultivo controladas (WHO, 1995).

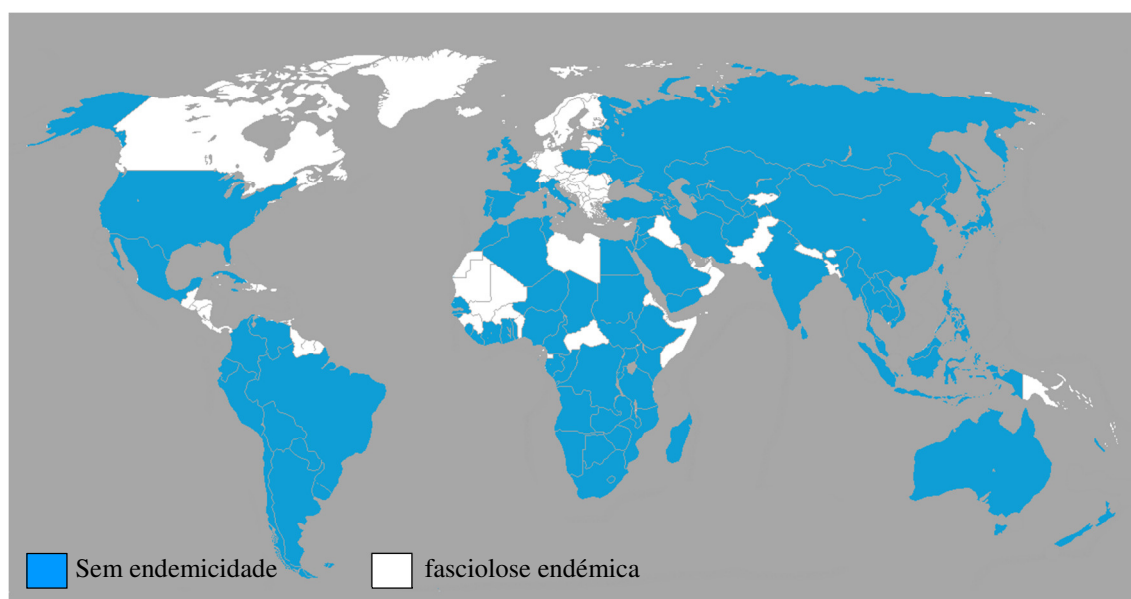


Figura1. Regiões onde fasciolose é endêmica (adaptado de <http://www.bvgh.org/Biopharmaceutical-Solutions/Global-Health-Primer/Diseases/cid/ViewDetails/ItemID/23.aspx>).

1.4. Fasciolose em Portugal

1.4.1. Continente

Entre 1946 e 1955 foram diagnosticados 12 casos de fasciolose, distribuídos de norte a sul do país, (Fonseca *et al.*, 1956). Mais tarde, em 1965, 1968 e 1973 foram efectuados alguns inquéritos malacológicos, tendo sido identificados vários focos de fasciolose. Desde então o número de casos positivos tem aumentado, deixando de ser considerada uma doença rara em Portugal, chegando mesmo a considerar-se uma problemática com elevada importância em saúde pública (Sampaio-Silva *et al.*, 1980, Rombert & Grácio, 1984, Rombert *et al.*, 1991), apresentando-se Portugal como o

segundo país da Europa com maior prevalência da doença, cerca de 1115 casos (Esteban *et al.*, 1998).

Nos animais, como é o caso dos ovinos, o parasita pode causar a morte, durante a fase aguda da doença. No entanto, esta doença é responsável não só por elevadas perdas, relativamente ao animal, como é o caso da diminuição da posição ponderal, da produção de lã e de leite (que não só diminuem a quantidade como qualidade), como também pela rejeição de algumas carcaças e dos fígados parasitados (Mendonça & Barata, 1992). Contudo, apesar dos prejuízos causados pela fasciolose nos animais, não existem dados estatísticos nem epidemiológicos da doença (Conceição *et al.*, 2004).

Porém, a fasciolose animal não se limita apenas aos prejuízos causados nos próprios animais, ela tem também um papel na transmissão da doença aos humanos e na manutenção de focos de infecção (Mendonça and Barata, 1992).

1.4.2. Madeira

A Madeira, pode caracterizar-se, para além de muitos outros factores, pela abundância e variedade de cursos de água ao longo de toda a ilha (França & Almeida, 2003), o que torna a região favorável à instalação de moluscos de água doce.

O primeiro caso de fasciolose humana em Portugal foi diagnosticado por Fonseca & Fraga de Azevedo em 1947 numa doente da ilha da Madeira (Fonseca & Azevedo, 1948). Em 1988, Fonseca e Almeida referiram que apesar de existirem evidências de casos, a fasciolose humana não é considerada endémica na ilha.

Em 1990 assinalaram-se mais oito casos e, posteriormente, um caso confirmado e dois por confirmar (Fonseca *et al.*, 1991).

Relativamente à fasciolose animal, de acordo com os últimos relatos, a situação é bastante diferente. De acordo com (Fonseca & Almeida, 1988), a fasciolose animal apresenta elevados prejuízos económicos e de saúde, com grande impacte no gado bovino, e algum impacte no gado ovino e caprino.

2. O Parasita - *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758

Identificado por Jehan de Brie em 1379, *F. hepatica* foi o primeiro tremátode a ser descoberto, cerca de 500 anos antes de todos os outros (Cook and Zumla, 2003). No entanto, só mais tarde, em 1758, veio a ser denominado de *F. hepatica*, por Linnaeus. Em 1831, Creplin iniciou a descodificação do ciclo de vida, descobrindo o desenvolvimento dos ovos, e do miracídio). Leuckart, em 1882 e Thomas, em 1883, completaram o conhecimento integral do ciclo de vida do parasita. Em 1854 por intermédio de Gerlach e depois, em 1914, por Sinitsin, foi demonstrado o ciclo de vida intrínseco do helminta por via directa do intestino ao fígado, confirmado mais tarde por outros investigadores (Cruz Ferreira & Freire de Oliveira, 1960).

O parasita *F. hepatica* é um tremátode achatado dorsoventralmente, em forma de folha, com simetria bilateral, de dimensões mais alargadas no terço anterior, apresentando um cone cefálico na extensão anterior do corpo (Figura 2). A extremidade posterior apresenta-se pontiaguda. As dimensões estão compreendidas entre 20/50 mm de comprimento e 6-13 mm de largura. Apresenta 2 ventosas relativamente pequenas, uma oral e outra ventral um pouco maior.

Os parasitas adultos vivem no fígado, mais precisamente nos ductos biliares do hospedeiro definitivo. Os ovos são relativamente grandes (130/150 x 60/90 µm), de forma ovóide, com um opérculo (Figura 3) (Guerrant *et al.*, 2011, Mas-Coma & Bargues, 1997).

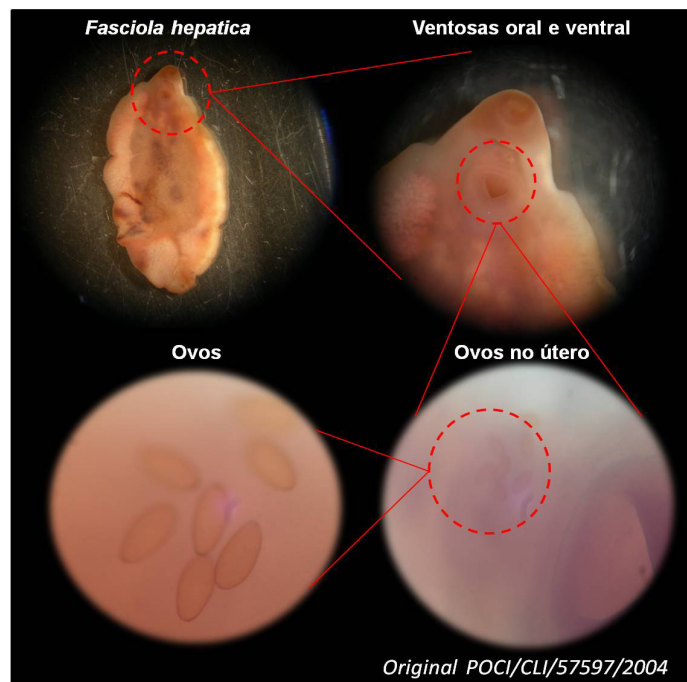


Figura 2. Morfologia de *F. hepatica* (original P. Ferreira).



Figura 3. Ovo de *F. hepatica* (original P. Ferreira).

2.1. Sistemática

Phylum Platyhelminthes

Classe Digenea

Ordem Echinostomatida

Família Fasciolidae Railliet, 1985

Género *Fasciola* Linnaeus, 1758

Espécie *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758

2.2. Ciclo de vida

O Ciclo de vida de *F. hepatica* é um ciclo heteroxénico, envolvendo dois hospedeiros. Um hospedeiro definitivo vertebrado, mamífero, e um hospedeiro intermediário invertebrado, molusco do género *Lymnaea* (Figura 4).

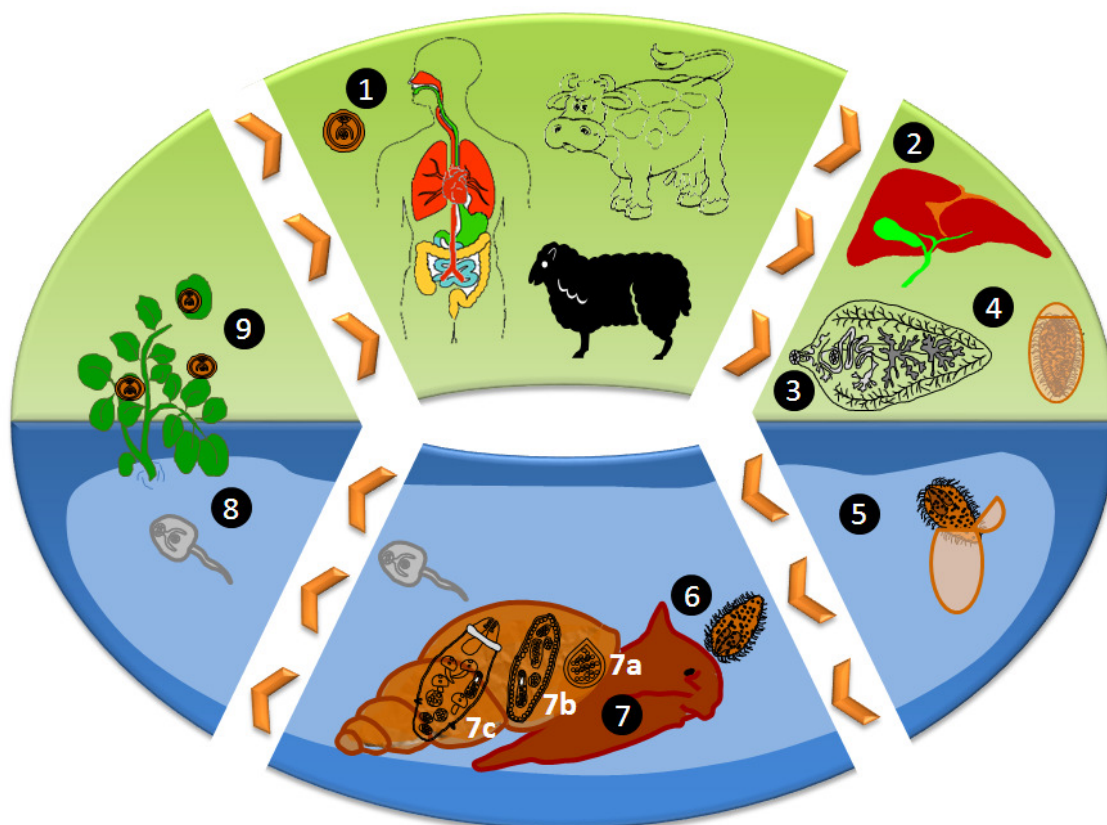


Figura 4. Ciclo de vida de *F. hepatica*. Pedro Ferreira/IHMT

Metacercária

A infecção dos mamíferos, hospedeiros definitivos, dá-se através da ingestão de plantas aquáticas contendo as metacercárias^①. Os humanos geralmente infectam-se ao ingerirem agriões crus ou com insuficiente processamento térmico, bem como com água contaminada com as referidas metacercárias (Saba *et al.*, 2004). Após a ingestão, e ao atingirem o duodeno, as metacercárias vão desenquistar, por acção dos sucos digestivos, e migrar através da parede intestinal, cavidade peritoneal e parênquima hepático até atingir os canais biliares^②

Lymnaea truncatula em Portugal: contribuição para o estudo da bioecologia e da variação genética.

Parasita adulto

Nos canais biliares, as metacercárias desenvolvem-se até atingir a fase adulta^③ e aí podem permanecer durante vários anos. Nos humanos, a maturação, desde a ingestão da metacercária até a eliminação dos ovos leva cerca de 3 a 4 meses, no entanto pode levar entre 3 e 18 meses (WHO, 1995).

Ovos

Os ovos imaturos são libertados nos ductos biliares e excretados juntamente com as fezes^④. Ao entrarem em contacto com a água, os ovos vão sofrer um processo de embrionamento (durante 15 a 20 dias na água), libertando posteriormente os miracídios^⑤ (Rombert *et al.*, 1991). O miracídio ao encontrar o hospedeiro intermediário adequado, um gastrópode de água doce do género *Lymnaea* vai prosseguir o seu ciclo de vida.

Hospedeiro intermediário

Ao encontrar o hospedeiro intermediário, o miracídio penetra activamente nos seus tecidos^⑥, passando posteriormente por várias fases de desenvolvimento^⑦, nomeadamente de esporocisto (7a), rédia (7b, 7c) e cercária.

Cercária

As cercárias são eliminadas do molusco^⑧ e, por acção da cauda, vão nadar e, posteriormente enquistar sob a forma de metacercária na vegetação aquática e outras superfícies existentes na água^⑨, ou na falta delas, na própria água. O processo de enquistamento é relativamente rápido, podendo levar desde alguns minutos até poucas horas. (Rombert *et al.*, 1991)

O período que vai desde a ingestão das metacercárias e o aparecimento de sintomas, leva cerca de 4 a 6 semanas, mas varia consideravelmente, dependendo do número de metacercárias ingeridas e da resposta do hospedeiro. Como já foi referido, entre a ingestão das metacercárias e a eliminação de ovos leva cerca de 4 meses. No entanto, pode demorar entre 3 e 18 meses (WHO, 1995).

Lymnaea truncatula em Portugal: contribuição para o estudo da bioecologia e da variação genética.

3. Hospedeiros intermediários - *Lymnaea truncatula* Muller, 1774

3.1. Considerações gerais

Os hospedeiros intermediários de *F. hepatica* são gastrópodes de água doce do género *Lymnaea* Lamark, 1799. Dentro do género *Lymnaea*, várias são as espécies que actuam como hospedeiros intermediários daquele parasita, como se indica na Tabela 1.

Tabela 1. – Espécies de hospedeiros intermediários de *F. hepatica* dentro do género *Lymnaea*, consoante a região do globo (adaptado de Mas-Coma & Bargues, 1997).

Hospedeiros Intermediários principais ou obrigatórios	
Espécie	Localização no Globo
<i>L. truncatula</i>	Europa
<i>L. truncatula</i>	Altiplano do Norte da Bolívia
<i>L. truncatula</i> ; <i>L. columella</i>	Africa
<i>L. humilis</i> ; <i>L. bulimoides</i> ; <i>L. cubensis</i>	América do Norte
<i>L. viatrix</i> ; <i>L. diaphana</i>	América do Sul
<i>L. truncatula</i> ; <i>L. viridis</i>	Asia
<i>L. tomentosa</i>	Austrália
<i>L. truncatula</i> ; <i>L. columella</i>	Nova Zelândia
<i>L. viridis</i> ; <i>L. ollula</i>	Havai; Papua Nova Guiné, Filipinas Japão
Hospedeiros alternativos ou facultativos	
<i>L. palustris</i> ; <i>L. glabra</i>	Europa
<i>L. columella</i>	Américas do Norte e do Sul
<i>L. columella</i> ; <i>L. viridis</i>	Austrália

O gastrópode *L. truncatula* Muller, 1774 (Mollusca, Pulmonata, Lymnaeidae), também denominado de “dwarf pond snail”, ou molusco dos pequenos lagos (Heppleston, 1972), tem sido descrito como único hospedeiro intermediário de *F. hepatica*, em Portugal, incluindo nos arquipélagos da Madeira e dos Açores (Fonseca & Almeida, 1988, Grácio, 1981, Grácio, 1992, Mendonça, 1992a) e como principal no resto da Europa (Hammami & Ayadi, 1999, Jabbour-Zahab *et al.*, 1997). Em Portugal, os dados epidemiológicos sobre *L. truncatula*/fasciolose datam de 1984, e foram apresentados por Rombert & Grácio. Na altura, os distritos com maior prevalência de

fasciolose, eram Porto, Aveiro, Leiria, Bragança, Viana do Castelo, Faro, Coimbra e Guarda, sendo estes três últimos os distritos onde se verificaram os valores mais elevados de fasciolose.

L. truncatula encontra-se distribuída por várias regiões do globo: um pouco por toda a Europa, ilhas Feroe, arquipélagos da Madeira e dos Açores, vários países asiáticos como Síria, Iraque, Irão, Afeganistão, região norte do Paquistão (acima dos 1200 m de altitude). No continente americano tem sido registada no Canadá, e no norte dos Estados Unidos da América (EUA). Em África pode ser encontrada, no norte do continente, Etiópia, Quênia, Camarões e África do Sul (Euzeby, 1970).

3.2. Sistemática

Phylum Mollusca

Classe Gastropoda

Sub-classe Pulmonata

Ordem Basommatophora

Família Lymnaeidae Rafinesque, 1815

Género *Lymnaea* Lamarck, 1799

Espécie *Lymnaea* (*Galba*=*Fossaria*) *truncatula* Müller, 1774

3.3. Aspectos morfológicos

Os gastrópodes *L. truncatula* possuem uma concha de formato globoso, cónico e espiralada com cerca de 5 a 6 voltas ou espiras truncadas, convexas, apresentando uma tonalidade acastanhada (Figura 5). O formato da concha é, todavia, uma característica muito variável mesmo entre espécies muito semelhantes, e parece estar relacionada com a intensidade da corrente no curso de água, ou até mesmo com as condições ambientais (Wulschleger & Ward, 1998). Apresenta abertura dextrorsa, com lábio interno rebatido formando uma projecção achatada sobre o *umbilicos*. Os adultos medem entre 7 e 12 mm (Mandahl-Barth, 1962, Brown, 1994)



Figura 5. Morfologia da concha de *Lymnaea truncatula*. (original P. Ferreira)

Os olhos localizam-se na base dos tentáculos, os quais são achatados e de forma triangular. O manto apresenta um aspecto pigmentado. A morfologia do aparelho reprodutor é característica de cada espécie, dentro do género, no entanto nos exemplares mais jovens, o aparelho genital não se encontra totalmente desenvolvido, dificultando a sua distinção (Valente & Vicente-Picciochi, 1979). Evidencia um pénis e uma bainha do pénis relativamente curtos e uma próstata com uma prega simples e pequena (Figura 6).

A rádula apresenta um aspecto característico que é o facto do primeiro dente lateral ser tricúspide.

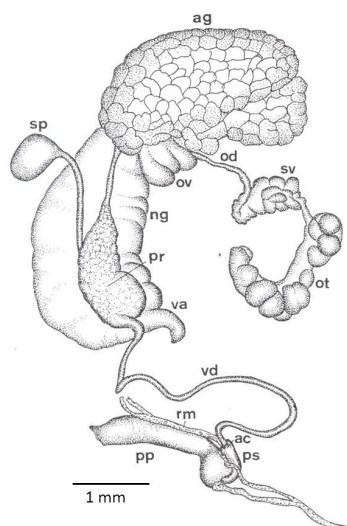


Figura 6. Caracteres anatómicos do aparelho reprodutor de *L. truncatula* de Limoges, França: ac=câmara apical; ag=glândula do albúmen; od=oviespermiduto; ot= ovotestis; ov= oviduto; pr= próstata; pp= prepúcio; ps= bainha do pénis; rm= músculo retrator do complexo peniano; sd= espermiduto; sp= espermateca; va= vagina. [Adaptado de (Samadi *et al.*, 2000)]

Objetivos

Objectivos gerais

1. Contribuir para o conhecimento da distribuição de *L. truncatula* em quatro distritos de Portugal continental (Coimbra, Évora, Leiria e Lisboa) e na ilha da Madeira;
2. Avaliar a variação da densidade populacional de *L. truncatula* ao longo do ano;
3. Caracterizar os habitats de *L. truncatula* nos cinco distritos de Portugal continental e na ilha da Madeira
4. Determinar a Influência dos parâmetros físicos, físico-químicos e biológicos dos habitats, na densidade populacional de *L. truncatula*.
5. Determinar a variabilidade genética dos moluscos *L. truncatula* colhidos nos cinco distritos de Portugal continental e na ilha da Madeira
6. Estudar a variabilidade inter- e intra-populacional de *L. truncatula*
7. Comparar *L. truncatula* com outras espécies de moluscos do género *Lymnaea*;

Objectivos Específicos

Os objectivos específicos serão apresentados em cada capítulo, de acordo com a temática de cada um deles.

Capítulo I

Bioecología de *Lymnaea truncatula*

1. Introdução

1.1. Considerações gerais

No estudo dos habitats de *Lymnaea truncatula* há que ter em conta alguns aspectos fundamentais: as suas biologia e exigências tróficas e ambientais. O carácter anfíbio destes moluscos é de extrema importância tanto ao nível da epidemiologia do molusco como no controlo da fasciolose. Existem 4 factores fundamentais nos biótopos de *L. truncatula*, assim como da maioria dos gastrópodes de água doce, factores esses, cruciais para a sua sobrevivência que são: água, luz, temperatura e natureza do solo (Mendonça, 1992b).

A existência de habitats de moluscos depende da interacção de um certo número de factores físicos no ambiente: a) a natureza das formações geológicas determina a permeabilidade do solo: os solos argilosos retêm mais água do que os arenosos; b) a topografia influencia directamente a capacidade de drenagem dos terrenos. Ambos os factores são cruciais para a natureza dos habitats, determinando o seu carácter permanente ou temporário. Estes factores, associados ao clima e à relação entre a chuva nos meses de Inverno e evaporação da água devido às temperaturas elevadas nos meses de Verão podem determinar a presença ou ausência de formação de habitats de moluscos (Ollerenshaw & Smith, 1969).

1.2. Alguns aspectos da biologia de *L. truncatula*

Apesar de *L. truncatula* ser um molusco aquático, possui também um carácter anfíbio, o que lhe confere alguma resistência a condições ambientais adversas, vivendo por vários períodos no lodo existente nos ribeiros e cursos de água (Kendall, 1970, Wright & Swire, 1984, Mendonça, 1992a, Xavier *et al.*, 1965, Mas-Coma & Bargues, 1997). Aquele carácter anfíbio, assim como a capacidade de estivação são factores determinantes para a sobrevivência do molusco e, consequentemente, para a sua disseminação de formas larvares do parasita (ex. esporocistos, rédias) (Mendonça, 1992a).

Há autores que defendem que durante o ciclo de vida normal, estes gastrópodes passam por pequenos períodos de estivação. Normalmente estes períodos estão ligados ao carácter temporário da maioria dos habitats, correspondendo ao período de ausência

de água (Kendall, 1954). Estes períodos de quiescência, de Inverno e de Verão, são muito vantajosos para prolongar a vida dos moluscos (Euzeby, 1970). Este fenómeno é condicionado pela temperatura e humidade, e esta transição é crucial para promover o desenvolvimento das populações de *Lymnaea*.

L. truncatula apresenta elevadas fecundidade e taxa de eclosão, com um período de incubação curto. Os moluscos jovens atingem rapidamente a maturidade sexual. Este aspecto, associado à capacidade de autofecundação, é importantíssimo, na medida que permite a repovoação rápida dos habitats, após um período de estivação (Euzeby, 1970, Grácio, 1992).

Os moluscos *L. truncatula* depositam os seus ovos no substrato disponível nas colecções de água (pedras, algas e outras plantas, outros suportes sólidos). Segundo Grácio (1992), e com base em estudos laboratoriais a maior parte das massas de ovos, são depositadas junto à superfície da água. Cada massa contém em média 9 ovos, podendo, no entanto, ir de 1 a 18. O período de incubação varia entre 8 e 14 dias (Grácio, 1992, Roberts, 1950). A massa dos ovos, uma vez fora de água, consegue manter os embriões vivos por um período máximo entre 4 e 12 horas (Roberts, 1950).

As alterações climáticas/ambientais, a acção dos humanos na construção de barragens e cursos de água vêm desenvolvendo uma grande influência na disseminação deste molusco. A disseminação dos moluscos *L. truncatula* na Europa é favorecida com a exportação comercial de gado. Muitos moluscos existentes nos charcos das pastagens, são veiculados para outros pontos, agarradas aos cascos dos animais.

1.3. Tipos de habitat e substrato

Os habitats de *L. truncatula* são geralmente cursos de água, de carácter permanente ou temporário, como pequenos riachos e ribeiros. No entanto, são também encontrados em pequenos lagos (Grácio, 1992). Nestes habitats, os moluscos podem encontrar-se em zonas de pouca profundidade (máximo 20 cm), normalmente nas rochas, vegetação aquática ou na lama. Alguns moluscos encontram-se mesmo fora da água, na lama ou em pequenas cavidades húmidas que utilizam como abrigo, nas margens do habitat (Grácio, 1983, Grácio, 1985, Hammami & Ayadi, 1999). Alguns autores defendem mesmo que esta espécie de moluscos passa a maior parte do tempo fora de água na lama, e entram ocasionalmente no curso água. No entanto, e apesar de

poderem sobreviver durante vários meses enterrados na lama e de se encontrarem muitas vezes fora de água, apenas têm capacidade de se reproduzir dentro de água, talvez, devido à natureza e disponibilidade dos seus alimentos. É dentro de água que se encontram as posturas, e consequentemente os moluscos recém-eclodidos (Hammami & Ayadi, 1999).

As barragens, sejam elas naturais ou artificiais asseguram o provimento de água para os animais, e ao mesmo tempo, tornam-se um bom local de sobrevivência dos moluscos, protegendo-os de temperaturas extremas, tanto demasiado elevadas como baixas, ou até mesmo grandes alterações de volume da água como seca ou mesmo enchentes que levam ao arrastamento dos moluscos, provocando assim a sua disseminação por outras zonas. As áreas pantanosas em torno dos grandes lagos, ou mesmo os canais de drenagem também constituem ótimos habitats para esta espécie de gastrópode, em várias regiões do globo, como é o caso do continente australiano. No entanto, em países como a Nova Guiné, estes moluscos parecem habitar cursos de água com corrente mais forte, talvez para contrariar as altas temperaturas que se verificam na região (Boray, 1969).

Apesar destes moluscos terem uma preferência por biótopos com substrato argiloso, com maior apetência para fixar a humidade, podem colonizar cursos de água com os mais variados tipos de substrato e de textura do solo (Mendonça, 1992b). Os solos argilosos ao possuírem uma maior capacidade de fixar a humidade, permitem o desenvolvimento das algas clorofícias, alimento preferencial de *L. truncatula* (Euzeby, 1970).

Na ilha da Madeira, os habitats de *L. truncatula* são ribeiros, tanques de rega e levadas. No entanto, parece que existe uma preferência por paredões basálticos ou areníticos, com boa exposição solar e escorrimento contínuo. Normalmente as cotas de altitude são baixas, no máximo 600 m (Fonseca & Almeida, 1988).

Na ilha de São Miguel, no arquipélago dos Açores, estes gastrópodes habitam os mais variados locais, como: charcos, escorrimentos de encosta, escorrimento para pasto, escorrimentos de tanque, lagoas, lameiros, levadas, nascentes, pastagens (alagadas), ribeiras e tanques, sendo as pastagens o habitat preferencial (Mendonça, 1992b).

Segundo (Grácio, 1985) os moluscos *L. truncatula* apresentam, geralmente, preferência por águas límpidas.

1.4. Tipo de vegetação

A vegetação presente nos habitats de *L. truncatula* é normalmente baixa, pouco densa, permitindo assim a passagem da luz solar, factor fundamental ao crescimento de algas clorofíceas, que servem de alimento aos moluscos (Mendonça, 1992b). Não parecem existir evidências de plantas específicas nos habitats de *L. truncatula*. No entanto uma espécie comumente encontrada nestes habitats é *Nasturtium officinale* (Roberts, 1950), o vulgar agrião, que é, como já foi referido anteriormente, a principal fonte de contaminação humana com o parasita *F. hepatica*.

No caso da ilha da Madeira, a vegetação nos habitats também é variada, especialmente do tipo muscíneo (Fonseca & Almeida, 1988).

1.5. Temperatura e pH dos habitats

Uma vez que os moluscos desta espécie passam grandes períodos fora de água, na lama dos biótopos, há que ter em atenção as características dos dois elementos, água e solo. Os moluscos do género *Lymnaea* parecem resistir melhor a temperaturas mais baixas do que às mais elevadas. As temperaturas demasiado elevadas, levando a seca extrema, parecem ser demasiado adversas às populações de moluscos. (Mas-Coma & Bargues, 1997). Podem sobreviver a temperaturas na ordem dos 0°C -2°C e no máximo de 25°C-28°C. No entanto, na presença de temperaturas abaixo dos 10°C e acima dos 20°C a sua actividade e vitalidade é reduzida.

Segundo Roberts (1950), parece haver alguma correlação entre a distribuição de *L. truncatula* e os valores de temperatura da água e do solo dos habitats. No entanto, estes parâmetros apresentam algumas variações consoante a região. Assim, podemos ter valores de temperatura da água a variar entre 10,5°C e 24°C (Grácio, 1983, Grácio, 1985), 11°C e 22°C (Goumghar *et al.*, 2004), 20°C e 22°C (Euzeby, 1970). Quanto à temperatura do solo, pode variar entre 20°C e 22°C (Mendonça, 1992b).

Quanto aos valores de pH da água dos habitats, também estão descritas algumas variações consoante a região. Em Tozeur (sul da Tunísia) o pH mais favorável encontra-se entre 7,6 e 7,9. (Hammami & Ayadi, 1999). Em Portugal, com base em estudos efectuados por Grácio em 1983 e 1985 em diferentes regiões do país, também se encontraram alterações dos valores de pH como 6.0-7.5 na região algarvia e 4,5-7,5 no interior da região alentejana.

Quanto ao pH do solo, segundo (Euzeby, 1970), os valores variam entre 6,6 e 8,6. Valores inferiores a estes começam a ser críticos, devido à dificuldade de sobrevivência destes moluscos em meio ácido.

2. Objectivos

- Contribuir para o conhecimento da distribuição de *L. truncatula* em quatro distritos de Portugal continental (Coimbra, Évora, Leiria e Lisboa) e ilha da Madeira;
- Avaliar a variação da densidade populacional de *L. truncatula* ao longo do ano;
- Caracterizar os habitats de *L. truncatula* nos quatro distritos de Portugal continental e ilha da Madeira
- Determinar a Influência dos parâmetros físicos, físico-químicos e biológicos dos habitats, na densidade populacional de *L. truncatula*.

3. Material e Métodos

No cumprimento dos objectivos propostos, foram efectuados inquéritos malacológicos em quatro distritos de Portugal Continental e na Madeira. Os inquéritos contemplaram a colheita de moluscos e água dos potenciais habitats de moluscos, assim como a recolha de dados relativos às suas condições físicas e químicas. Sempre que possível, colheram-se fezes de animais, existentes junto às colecções de água, para pesquisa de ovos de *F. hepatica*. Recolheram-se ainda, fígados de animais abatidos na Tapada Nacional de Mafra (TNM) para pesquisa de *F. hepatica*.

3.1. Trabalho de campo

3.1.1. Locais estudados

A selecção da localização dos habitats a estudar baseou-se em dados sobre a fasciolose em Portugal (Rombert & Grácio, 1984, Xavier *et al.*, 1965). Assim, em Portugal continental, foram escolhidos os distritos de Coimbra, Évora e Leiria. A existência de evidências de fasciolose nos gamos (*Dama dama*) e javalis (*Sus scrofa castilianus*) da reserva da Tapada Nacional de Mafra / distrito de Lisboa (Barata, 1987 (1989), Maia, 2001), levaram à inclusão deste distrito no estudo.

Uma vez que não tínhamos um conhecimento prévio da localização das colecções de água doce potenciais habitats de moluscos Gastropoda, fomos procura-las em locais de fácil acessibilidade. As colecções de água doce onde se registou a presença de *L. truncatula* foram seleccionadas para o estudo desta espécie.

3.1.2. Calendarização

Nos distritos de Coimbra, Évora e Leiria, assim como na Tapada Nacional de Mafra foram efectuados inquéritos malacológicos bimestrais durante 2 anos, entre Janeiro de 2006 e Dezembro de 2007. A calendarização foi efectuada tendo como objectivo a monitorização dos habitats no que respeita às suas características físicas, físico-químicas da água e biológicas, ou seja, à monitorização da variação do número de moluscos ao longo do ano.

Relativamente à ilha da Madeira, foram efectuados dois inquéritos malacológicos: um em Julho (19 a 26) e outro em Novembro (23 a 28) de 2009. A

escolha teve como base a estação do ano, e o clima associado a ela, uma vez que assim seria possível obter dados no verão e no final do outono.

3.1.3. Colheita e transporte de moluscos

Os moluscos foram colhidos com pinça e/ou rede, de acordo com as características das colecções de água. No entanto, e uma vez que os moluscos da espécie *L. truncatula*, preferem habitats com pouca corrente, a rede foi pouco utilizada.

Como forma de padronização da técnica de colheita, com vista a uma uniformização dos resultados, seleccionaram-se as áreas e o tempo de colheita dos moluscos. O período definido para colheita foi de 15 minutos. A densidade dos moluscos foi avaliada pelo número de moluscos colhidos pelas mesmas 2 pessoas, durante aquele período de tempo, numa área definida e restrita.

Os moluscos colhidos em cada habitat foram colocados em caixas de plástico, separados por habitat e transportados para o laboratório de Malacologia do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT) – UEI de Parasitologia Médica, Grupo de Helmintologia e Malacologia Médicas.

3.1.4. Dados dos habitats

No local, foram registados o pH e a temperatura da água. Para cada colecção de água estudada, foi preenchido um formulário (Anexo 1) com várias informações relevantes para a sua caracterização como sendo: o tipo de habitat, substrato, vegetação na água e na margem, presença ou ausência de agriões (uma vez que se trata da potencial fonte de contaminação humana) e exposição solar.

Com a ajuda de GPS - *Geographic Positioning System* - foram ainda registadas as coordenadas dos locais dos habitats estudados, nomeadamente as latitude, longitude e altitude.

3.1.5. Colheita de água dos locais estudados

Para cada colecção de água estudada, colheram-se 200 ml de água da superfície para frascos SCHOTT esterilizados, para posterior doseamento de alguns parâmetros físico-químicos.

3.1.6. Colheita de fezes de animais

Sempre que se encontraram fezes de animais junto das colecções de água (Figura 7), colheram-se amostras para pesquisa de ovos de *F. hepatica*.

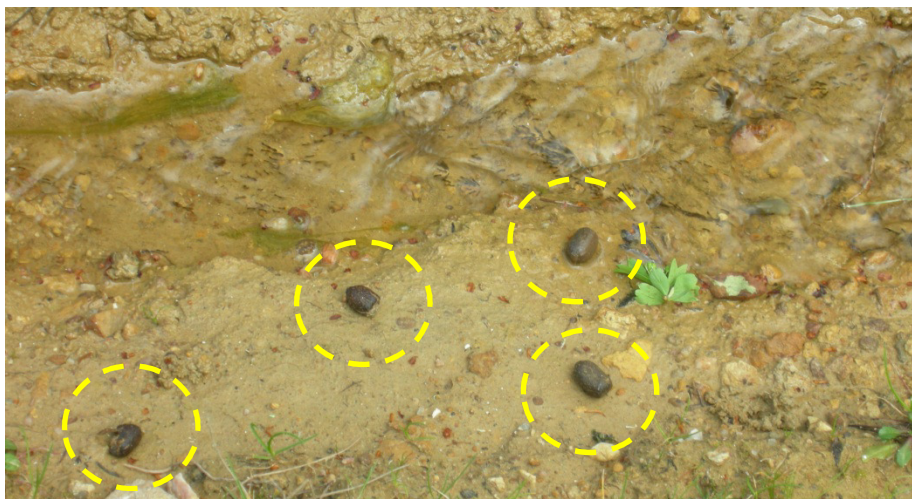


Figura 7. Fezes de animais junto às colecções de água. Original P. Ferreira

3.1.7. Recolha de fígados de animais

Uma vez que houve dias de colheita de moluscos que coincidiram com as datas seguintes a montarias na Tapada Nacional de Mafra, foram recolhidos e transportados para o laboratório de Helmintologia (IHMT), 3 fígados de gamo e 2 de javali, para pesquisa de *F. hepatica*.

3.2. Trabalho laboratorial

3.2.1. Estudo dos moluscos

Após chegarem ao laboratório, os moluscos foram contados, identificados e separados consoante a espécie e o habitat de proveniência.

Os moluscos identificados como *L. truncatula* foram expostos à luz artificial para estudos parasitológicos e colocados em etanol absoluto e conservados a 4°C, para os estudos morfológicos e de biologia molecular.

3.2.1.1. Identificação morfológica

A identificação dos moluscos foi feita com base na morfologia da concha (Hubendick, 1951, Malek & Cheng, 1974) (Figura 5).

3.2.1.2. Presença de *F. hepatica*

3.2.1.2.a. Pesquisa da eliminação de cercárias

Todos os moluscos colhidos foram expostos a uma fonte de luz artificial, para estimular a eliminação de cercárias, caso eles estivessem infectados. Assim, colocaram-se os moluscos dentro de copos de vidro de 50 ml, com água, sob a acção de uma fonte de luz artificial (candeeiro com lâmpada de 60W) durante 2 horas. Seguidamente retiraram-se os moluscos dos recipientes e observou-se a água neles contida, recorrendo a um estereomicroscópio para pesquisa de cercárias. Este procedimento foi repetido nos que continuaram vivos, até sessenta dias após a colheita dos moluscos.

3.2.1.2.b. Pesquisa de DNA de *F. hepatica* nos moluscos

De todos os moluscos colhidos escolheram-se 110 moluscos [110 identificados como *L. truncatula* e 3 como *Lymnaea* sp (colhidos na ilha da Madeira)] para pesquisa de DNA de *F. hepatica* no molusco por PCR – *Polymerase Chain Reaction*.

Foi extraído DNA total da região cefalopodal do molusco (formada pela cabeça e pelo pé) com CTAB (descrição no capítulo II)

As Sequências Iniciadoras (SeqIn) (*primer*) usadas foram descritas por (Magalhães *et al.*, 2004), para amplificar regiões conservadas e repetitivas do DNA mitocondrial do (*mtDNA*) de *F. hepática*, que consiste em repetições idênticas, em

tandem, de 85 nucleótidos (ricas em guaninas e citosinas): FASCF (5' ATA TTA AGA GTT GTG CCC C 3') e FASCR (5' CCA AAT AAA TAG ATC AGC CC 3').

As amostras foram sujeitas a um ciclo de desnaturação a 92°C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 92°C, 1 min; 55°C, 2 min e 72°C, 2 min, e por fim um ciclo para extensão da cadeia, a 72°C durante 10 minutos.

Terminada a reacção, 5 µl do produto foi observado num gel de agarose a 2%, com 3 µl de tampão de deposição e por fim observou-se a fluorescência emitida num documentador de imagem AlphaImager HP (Alpha Innotech). Juntamente com as amostras foi colocado um marcador de massa molecular de 1000 pares de bases - “Hyperladder IV” (Bioline).

As amostras foram todas purificadas, usando colunas de purificação QIAquick PCR™ da QIAGEN, e sequenciadas num sequenciador automático comercial (STABvida) (técnicas descritas no capítulo II).

3.2.2. Análise da água dos habitats

Foram doseados os seguintes parâmetros: dureza total e dureza carbonatada, sulfatos, nitratos, nitritos, amónio, cloro e cálcio e magnésio, pela importância de que se podem revestir no que respeita à presença de moluscos.

Dureza total, Dureza carbonatada, Cálcio e Magnésio

A dureza total da água é um parâmetro que está dependente da quantidade dos chamados «iões formadores de dureza», iões de cálcio (Ca^{2+}) e Magnésio (Mg^{2+}) presentes na água. A determinação da dureza total compreende a soma desses iões e é expressa em mg de óxido de cálcio (CaO) por litro de água.

A dureza carbonatada é, de entre os iões de Ca^{2+} e Mg^{2+} , presentes em 1 litro de água, a quantidade equivalente de iões hidrogenocarbonato (HCO_3^-) e iões carbonato (CO_3^{2-}). A relação de HCO_3^- e CO_3^{2-} depende dos valores de pH. Em águas com pH ácido (abaixo de 5,6), os moluscos apresentam dificuldade de promover a deposição do cálcio para a constituição da concha, impedindo a sua colonização (MSBrasil, 2007).

Sulfatos

As águas subterrâneas e superficiais contaminadas podem conter 300 mg ou mais de iões sulfato (SO_4^{2-}) por litro de água, tratando-se assim de um bom indicador de contaminação.

Nitratos

A carga crescente de nitratos nas águas subterrâneas e na água potável proveniente destas, apresenta cada vez mais um problema sanitário do ambiente, que tem efeitos principalmente na agricultura de uso intensivo. O nitrogénio dos nitratos atinge as águas superficiais e as subterrâneas por arrastamento, devido a uma fertilização fora de tempo e uma sobredose. Os nitratos são elementos essenciais ao desenvolvimento do plâncton, fundamental para alimento dos moluscos (MSBrasil, 2007).

Nitritos, amónia, cloretos

Em certas condições de anaerobiose, algumas bactérias desnitrificantes reduzem os nitratos a nitritos, assim como algumas outras reduzem nitritos a amónia. Estes dois parâmetros são, portanto, bons indicadores de poluição das águas, com efeitos nefastos ao desenvolvimento dos moluscos (MSBrasil, 2007).

Dado que se tratam de moluscos de água doce não seria de esperar muita tolerância ao cloro, no entanto, já foram encontrados níveis relativamente elevados de cloretos e até mesmo de amónia em vários habitats de moluscos (MSBrasil, 2007).

Cádmio, chumbo, cobre, níquel e zinco

Para verificar o grau de contaminação dos cursos de água estudados, efectuou-se ainda a pesquisa e doseamento de metais pesados: cádmio, chumbo, cobre, níquel e zinco.

Para os doseamentos utilizou-se uma técnica colorimétrica semi-quantitativa (Merckoquant®) de acordo com o protocolo do fabricante.

3.2.3. Análise das fezes de animais

A análise de fezes de animais para pesquisa de ovos de *F. hepatica* foi efectuada recorrendo à técnica de Telemann-Lima. A escolha desta técnica de concentração prende-se com o facto dos ovos de *F. hepatica* serem “grandes” e “pesados” e terem tendência para sedimentar.

Esta técnica baseia-se na obtenção de uma emulsão com duas fases não miscíveis, em que uma delas é aquosa e outra lipófila, permitindo assim separar as partículas fecais (parasitas, resíduos alimentares, bactérias). A separação processa-se de acordo com o equilíbrio hidrófilo-lipófilo, dos elementos da amostra, resultando na eliminação das fracções com predominância lipofílica, dado que são aqueles artefactos que mais interferem na visualização das preparações. Obtém-se assim uma concentração das partículas com predominância hidrofílica. No presente estudo preparou-se uma emulsão com cerca de 20 cm³ de água destilada, o equivalente a uma colher de café de fezes. A preparação obtida foi coada através de duas espessuras de gaze. O filtrado foi dispensado para um tubo de centrífuga enchendo-o até um terço da sua altura e, ao qual se adicionou igual volume de uma mistura feita com água e éter etílico, em partes iguais. O tubo foi tapado com uma rolha e agitado vigorosamente. A mistura foi centrifugada a 3000G (centrífuga HERMLE Z383K) durante 3 minutos. Após decantação, o sedimento foi observado entre lâmina e lamela de 22mmx22mm.

Foram analisadas 20 amostras de fezes de animais, 18 da Tapada Nacional de Mafra e 2 do distrito de Évora.

3.2.4. Análise dos fígados de animais

Foram feitas pesquisas de parasitas adultos *F. hepatica* em fígados de gamos e javalis abatidos em caçada na Tapada Nacional de Mafra. Os fígados foram colocados num tabuleiro de alumínio e com a ajuda de uma pinça e bisturi, foram abertos os canais biliares e exercida pressão sobre o fígado para forçar a saída de eventuais parasitas presentes no interior desses canais.

No total foram analisados 5 fígados de animais, 3 de gamo, e 2 de javali.

3.3. Análise estatística

Para análise estatística dos resultados recorreu-se ao software estatístico IBM® SPSS® Statistics (*Statistical Package for the Social Sciences*), versão 20 para Microsoft Windows.

Para determinar a correlação existente entre os parâmetros físico-químicos (temperatura da água, pH, concentrações de sulfatos, nitratos, cálcio, durezas total e carbonatada), e biológicos (número de moluscos de outras espécies) e o número de *L.*

truncatula colhidos, e uma vez que os dados não apresentavam uma distribuição normal, recorreu-se a testes não paramétricos, nomeadamente ao coeficiente de correlação de Spearman (Maroco, 2003).

Para avaliação da variação do número de moluscos *L. truncatula* colhidos em função das características físicas (vegetação e substrato) e físico-químicas dos habitats (concentrações de sulfatos, nitratos, cálcio, durezas total e carbonatada), efectuou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, para amostras independentes.

Os gráficos dos doseamentos efectuados nas águas dos habitats foram executados no programa Microsoft® Excel 2010, para Microsoft Windows. Uma vez que os dados obtidos são semi-quantitativos, e expressos em classes de valores, para execução dos gráficos e tabelas foram considerados os limites superiores das classes.

4. Resultados

4.1. Bioecologia de *L. truncatula* nos distritos de Coimbra, Évora, Leiria e Lisboa.

4.1.1. Estudo dos potenciais habitats de moluscos

Foram efectuadas 48 saídas de campo desde Janeiro de 2006 a Dezembro de 2007, a quatro distritos portugueses: Coimbra, Évora, Leiria e Lisboa (apenas Tapada Nacional de Mafra) (Figura 8).

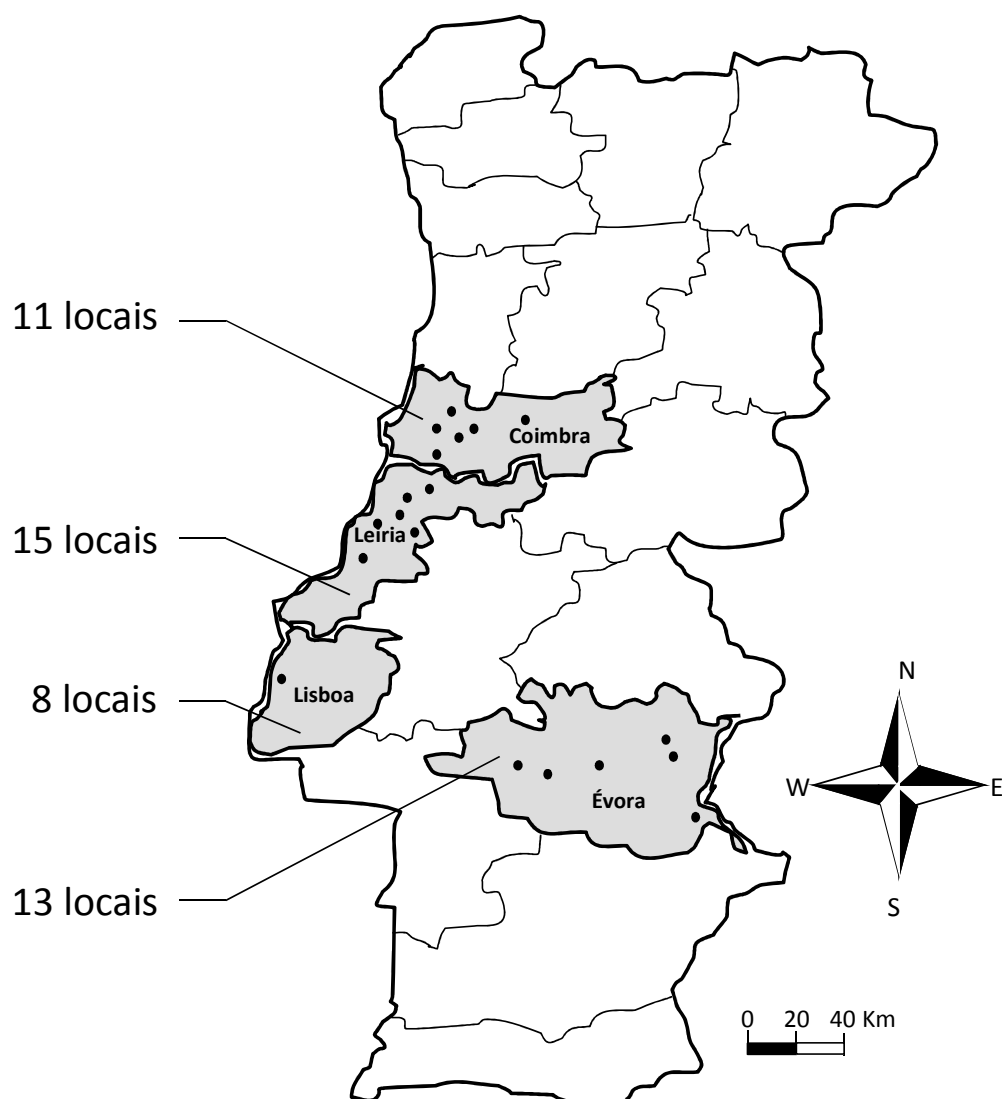


Figura 8. Mapa de Portugal continental, com indicação dos distritos onde se realizaram os estudos.

Ao todo, foram identificadas 47 colecções de água, com características favoráveis à instalação de moluscos.

4.1.1.1. Descrição dos locais estudados

Nos 47 locais estudados foi possível encontrar colecções de água de carácter quer temporário, quer permanente (Tabela 2), de vários tipos, que foram posteriormente agrupados de acordo com a Tabela 3, em: “Pequeno caudal de água” (PCA), “Ribeiro”, “Lagoa”, “Tanque”, “Charco” e “campo de cultivo de arroz” (CCA).

No geral, “Ribeiro” foi o tipo de colecção de água mais frequente entre os locais estudados (55,3%), seguida de “Pequeno caudal de água” (PCA) (23,4%) (Tabela 3). A maioria dos habitats tinha carácter “Temporário” (61,7%) (Tabela 2).

Tabela 2. Carácter das colecções de água nos 4 distritos estudados

Carácter do habitat	Distrito Lisboa	Distrito Leiria	Distrito Coimbra	Distrito Évora	Total
Permanente	3 (37,5%)	8 (53,3%)	4 (36,4%)	3 (23,1%)	18 (38,3%)
Temporário	5 (62,5%)	7 (46,7%)	7 (63,6%)	10 (76,9%)	29 (61,7%)
Total	8	15	11	13	47

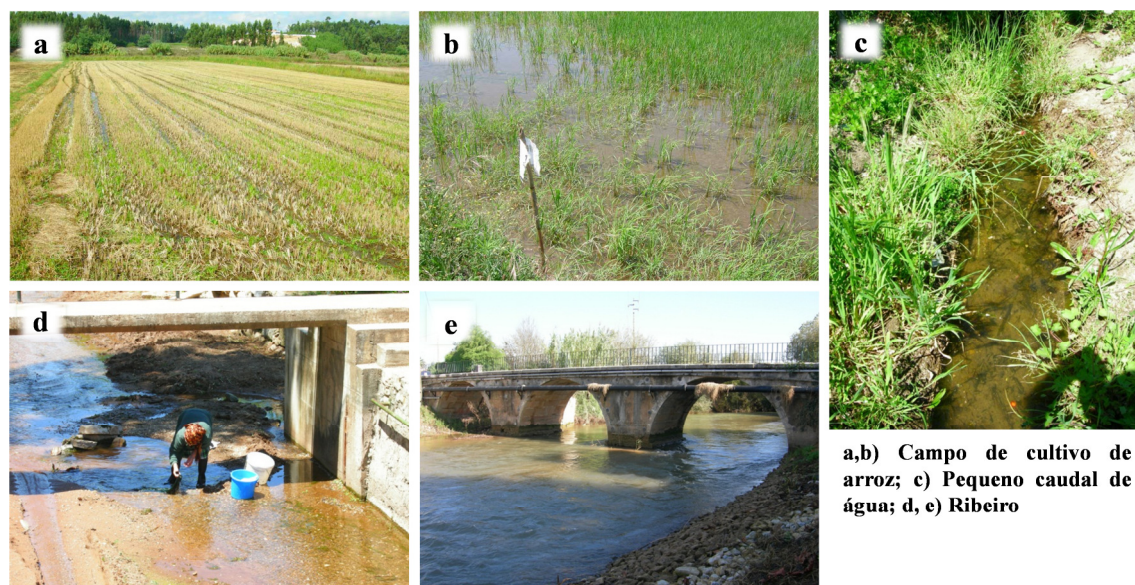
Tabela 3. Tipos de colecções de água encontrados nos 4 distritos estudados

Tipo de habitat	Tapada Mafra	Distrito Leiria	Distrito Coimbra	Distrito Évora	Total
PCA	5 (62,5%)	1 (6,7%)	2 (18,2%)	3 (23,1%)	11 (23,4%)
Tanque	3 (37,5%)	-	-	2 (15,4%)	5 (10,6%)
Ribeiro	-	12 (80%)	6 (54,5%)	8 (61,5%)	26 (55,3%)
Lagoa	-	1 (6,7%)	-	-	1 (2,1%)
Charco	-	1 (6,7%)	-	-	1 (2,1%)
CCA	-	-	3 (27,3%)	-	3 (6,4%)
Total	8	15	11	13	47

PCA – Pequeno caudal de água; CCA – campo de cultivo de arroz

No distrito de Coimbra, além de “Ribeiro” (54,5%), e “Pequeno caudal de água” (PCA) (18,2%) de carácter “Temporário” (63,6%) (Figura 12), foram identificados três habitats com características muito próprias, “Campo de cultivo de arroz (CCA) (27,3%) (figuras 9a,9b), que devido o tipo de cultura agrícola a que se destina faz com que os campos estejam irrigados praticamente durante todo o ano. À excepção da Figura 9c), todas as outras colecções de água ilustradas na Figura 9, apresentam um contacto

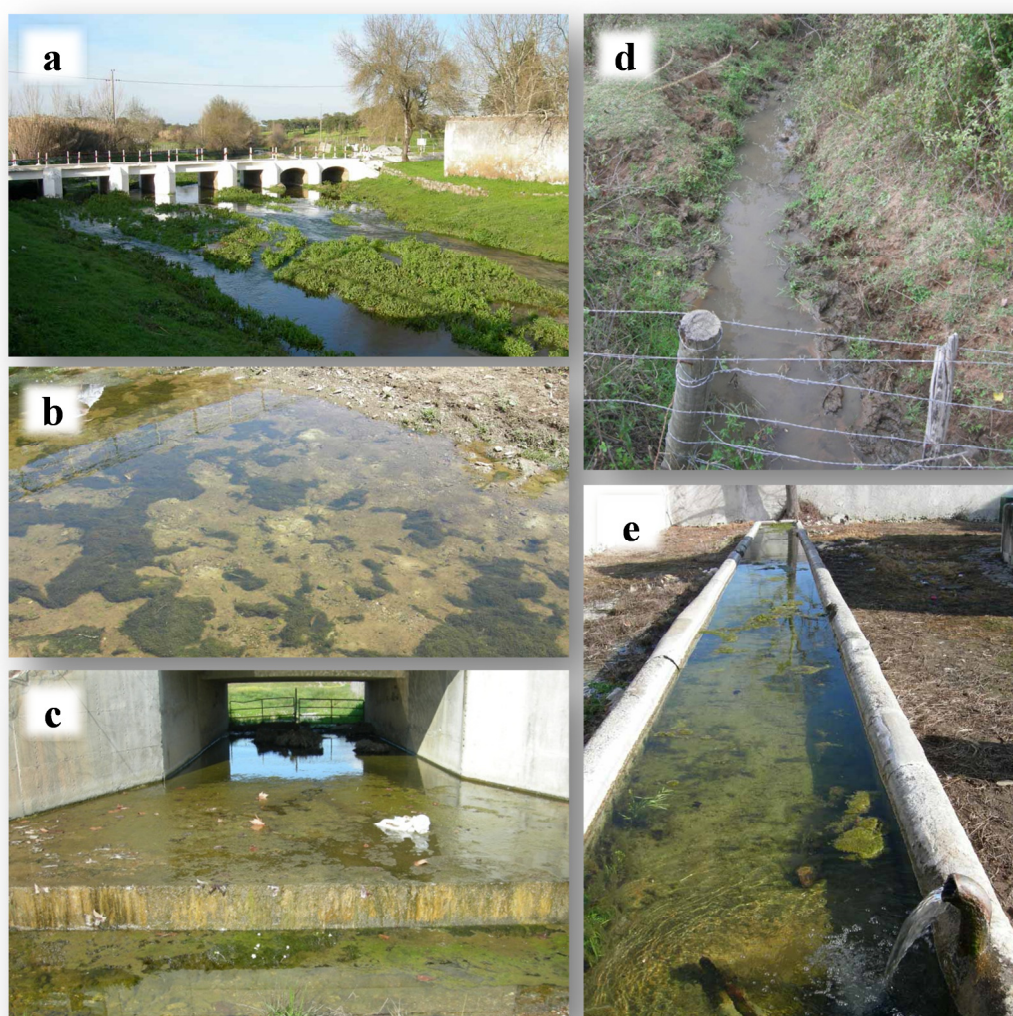
próximo com a população, seja ele para rega de culturas agrícolas, quer seja para lavar a roupa (Figura 9d), ou funcionar como piscina durante os meses de verão (como foi possível observar durante os trabalhos de campo).



a,b) Campo de cultivo de arroz; c) Pequeno caudal de água; d, e) Ribeiro

Figura 9. Colecções de água estudados no distrito de Coimbra

O distrito de Évora, pela à sua localização, e clima associado, com temperaturas extremas, apresentou vários tipos de colecções de água, como: “pequeno caudal de água” (PCA), “Ribeiro” de carácter maioritariamente “Temporário”, que, devido às elevadas temperaturas que se fazem sentir nos meses de verão, secam completamente (Figura 10). Sendo uma região de elevada produção agrícola e animal, o contacto da população humana, quer dos animais, com as colecções de água parece evidente. Estudaram-se ainda 2 locais do tipo “Tanque” e outros pequenos caudais de água, que servem de bebedouro a animais.



a) Ribeiro; b) Charco; c. d) Pequeno caudal de água; e) Tanque.

Figura 10. Colecções de água doce estudadas no distrito de Évora

No distrito de Leiria, os locais estudados foram maioritariamente do tipo “Ribeiro”, alguns de carácter “Permanente”, outros “Temporário”, apresentando todos eles alguns aspectos particulares (Figura 11). A Figura 11c) mostra um “pequeno caudal de água” (PCA), que fica localizado no interior de uma propriedade particular, onde o proprietário tem gado, bovino e ovino a pastar e faz igualmente cultura de agriões destinados a consumo humano, dentro do curso de água. As restantes colecções de água utilizadas pela população apenas nas actividades agrícolas.

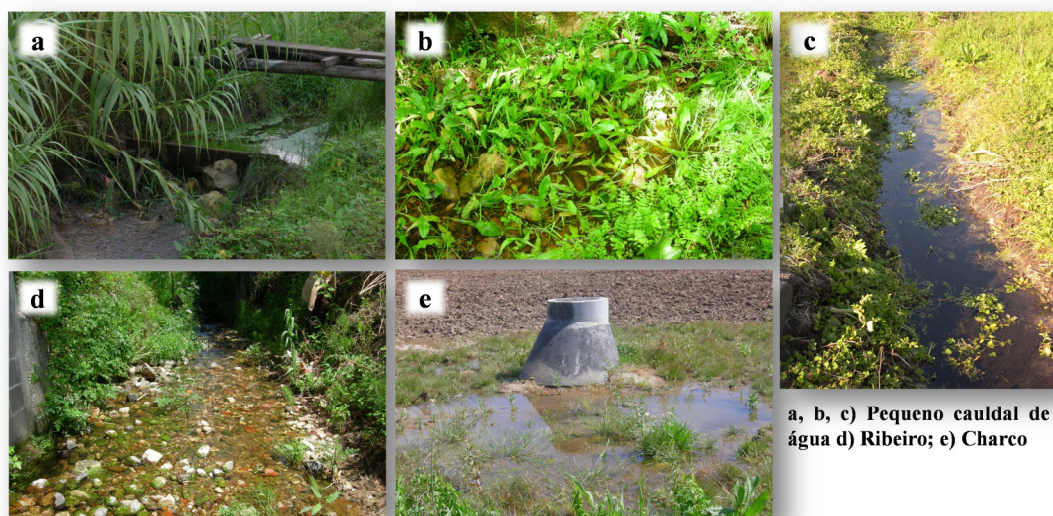


Figura 11. Colecções de água doce estudadas no distrito de Leiria

Na Tapada Nacional de Mafra, distrito de Lisboa, todas as colecções de água existentes servem de bebedouro aos animais, uma vez que eles circulam livremente no parque (Figura 12). À excepção dos três tanques estudados, as restantes colecções de água apresentaram carácter “Temporário”.

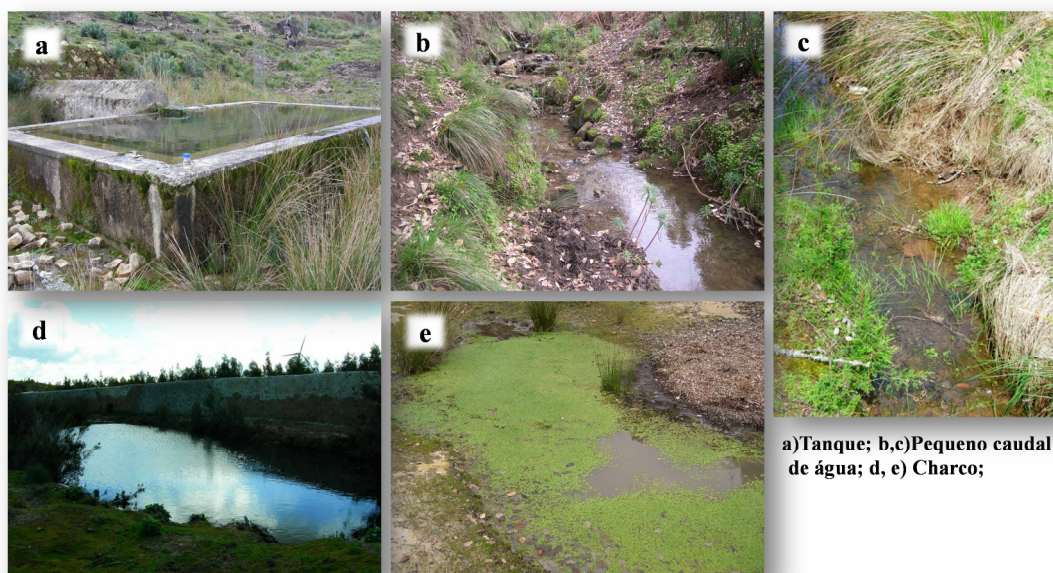


Figura 12. Colecções de água doce estudadas no distrito de Lisboa

Quanto à vegetação presente dentro das colecções de água, a maioria dos locais estudados apresentou vegetação “Leve” (76,6%) (Tabela 4) do tipo “Emergente+Imersa” (EMG+IMS) (36,2%) (Tabela 5).

Tabela 4. Carácter da vegetação existente nas colecções de água, nos 4 distritos estudados

Vegetação água	Distrito Lisboa	Distrito Leiria	Distrito Coimbra	Distrito Évora	Total
Nenhuma	1 (12,5%)	2 (13,3%)	-	1 (7,7%)	4 (10,6%)
Leve	7 (87,5%)	11 (73,3%)	7 (63,6%)	11 (84,6%)	36 (76,6%)
Densa	-	2 (13,3%)	4 (36,4%)	1 (7,7%)	7 (14,9%)
Total	8	15	11	13	47

Tabela 5. Tipo de vegetação presente na água

Vegetação água	Distrito Lisboa	Distrito Leiria	Distrito Coimbra	Distrito Évora	Total
Nula	1 (12,5%)	3 (20%)	-	1 (7,7%)	5 (10,6%)
FLUT	-	-	-	-	-
EMG	-	3 (20%)	1 (9,1%)	-	4 (8,5%)
IMS	3 (37,5%)	2 (13,3%)	1 (9,1%)	4 (30,8%)	10 (21,3%)
EMG+FLUT	-	-	-	-	-
EMG+FLUT+IMS	4 (50%)	-	1 (9,1%)	4 (30,8%)	9 (19,1%)
FLUT+IMS	-	1 (6,7%)	1 (9,1%)	-	2 (4,3%)
EMG+IMS	-	6 (40%)	7 (63,6%)	4 (30,8%)	17 (36,2%)
Total	8	15	11	13	47

(FLUT – flutuante; EMG – emergente; IMS - imersa)

O substrato existente nas várias colecções de água era composto por “Argila e Matéria em decomposição” (ARG+MDEC) (21,3%) (Tabela 6).

Tabela 6. Tipo de substrato nas colecções de água

Substrato	Distrito Lisboa	Distrito Leiria	Distrito Coimbra	Distrito Évora	Total
ARG	1 (12,5%)	1 (6,7%)	-	-	2 (4,3%)
AR	-	2 (13,3%)	-	-	2 (4,3%)
MDEC	3 (37,5%)	-	-	2 (15,4%)	5 (10,6%)
ARG+ROC	-	-	1 (9,1%)	2 (15,4%)	3 (6,4%)
AR+ARG	-	2 (13,3%)	-	1 (7,7%)	3 (6,4%)
ARG+HUM	-	-	-	1 (7,7%)	1 (2,1%)
ARG+MDEC	4 (50%)	-	4 (36,4%)	2 (15,4%)	10 (21,3%)
ROC+AR	-	2 (13,3%)	-	-	2 (4,3%)
AR+MDEC	-	1 (6,7%)	-	-	1 (2,1%)
ARG+ROC+AR+MDEC	-	3 (20%)	1 (9,1%)	1 (7,7%)	4 (8,5%)
ARG+HUM+MDEC	-	1 (6,7%)	-	1 (7,7%)	2 (4,3%)
ROC+AR+ARG	-	1 (6,7%)	3 (27,3%)	1 (7,7%)	5 (10,6%)
CIM+ARG	-	1 (6,7%)	1 (9,1%)	1 (7,7%)	3 (4,3%)
AR+ARG+HUM+MDEC	-	-	-	1 (7,7%)	1 (2,1%)
ROC+AR+HUM	-	-	1 (9,1%)	2 (15,4%)	3 (6,4%)
ROC+AR+MDEC	-	1 (6,7%)	-	-	1 (2,1%)
Total	8	15	11	13	47

(ARG-Argila; AR-Areia; MDEC-Matéria em decomposição; HUM-húmus; ROC-rochas; CIM-Cimento)

A vegetação na margem das colecções de água, no total dos distritos, não registou alterações evidentes, apresentando todos os itens, percentagens muito idênticas (Tabela 7).

Tabela 7. Quantidade de vegetação na margem das colecções de água

Vegetação margem	Distrito Lisboa	Distrito Leiria	Distrito Coimbra	Distrito Évora	Total
Nenhuma	3 (37,5%)	3 (20%)	4 (36,4%)	2 (15,4%)	12 (25,5%)
Pouca	1 (12,5%)	6 (40%)	4 (27,3%)	7 (53,8%)	18 (38,3%)
Muita	4 (50%)	6 (40%)	3 (27,3%)	4 (30,8%)	17 (36,2%)
Total	8	15	11	13	47

Quanto à presença de agriões, verificou-se que só aconteceu em 14,9% dos casos (Tabela 8).

Tabela 8. Presença de agriões dentro das colecções de água

Presença de agriões	Distrito Lisboa	Distrito Leiria	Distrito Coimbra	Distrito Évora	Total
Não	8 (100%)	12 (80%)	8 (72,7%)	12 (92,3%)	40 (85,1%)
Sim	-	3 (20%)	3 (27,3%)	1 (7,7%)	7 (14,9%)
Total	8	15	11	13	47

Observou-se ainda que a maioria dos habitats apresentava exposição “Total” ao sol (87,2%) (Tabela 9).

Tabela 9. Tipo de exposição solar nas colecções de água

Exposição solar	Distrito Lisboa	Distrito Leiria	Distrito Coimbra	Distrito Évora	Total
Parcial	-	-	1 (9,1%)	12 (92,3%)	1 (2,1%)
Fraca	-	3 (20%)			5 (10,6%)
Total	8 (100%)	12 (80%)	10 (90,9%)	1 (7,7%)	41 (87,2%)
Total	8	15	11	13	47

4.1.1.2. Doseamentos efectuados nas águas dos locais estudados

Os valores de pH (Figuras 13 e 14) variaram desde 6.10 até 9.15, valores estes atingidos no distrito de Coimbra. A média global foi de 7,41. O pH da água apresentou algumas variações ao longo do tempo, no entanto, não se observou qualquer relação ou paralelismo entre os dois anos de estudo, nos meses correspondentes.

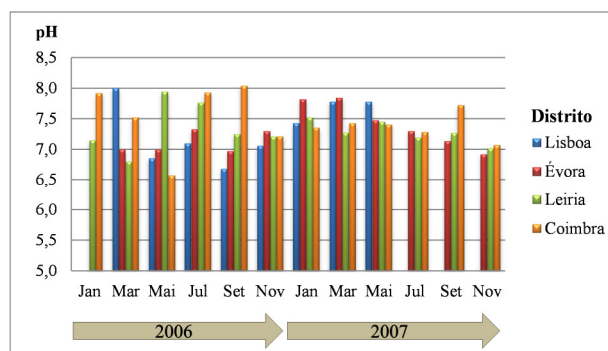


Figura 13. Valor de pH da água, média por distrito

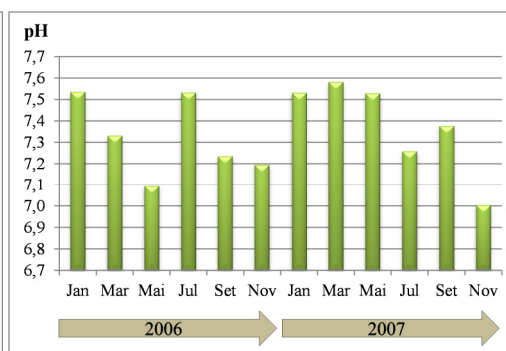


Figura 14. Valor de pH da água, média dos 4 distritos estudados

A temperatura da água mostrou uma grande variação ao longo do ano, com um mínimo de 8,3°C, no distrito de Leiria, e um máximo de 35,8°C, no distrito de Coimbra. (Figuras 15 e 16). Os valores de temperatura da água variaram ao longo do ano de acordo com as estações. (Assim no inverno observaram-se temperaturas mais baixas e no verão, temperaturas mais altas.)

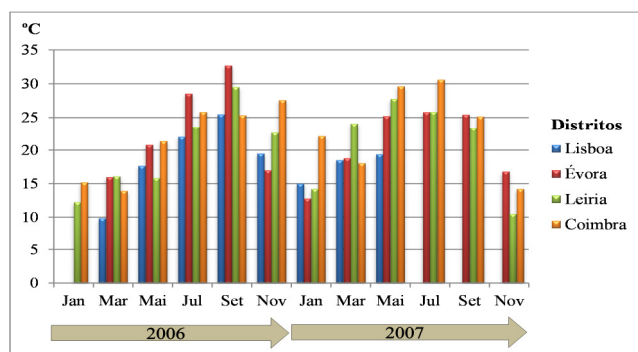


Figura 15. Temperatura da água, média por distrito

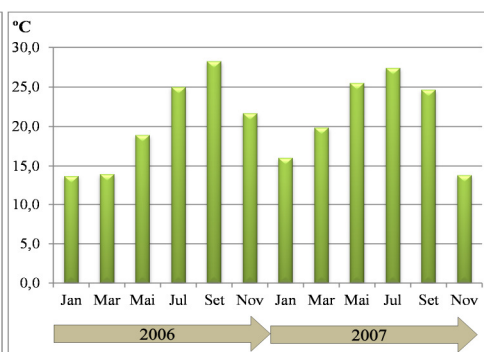


Figura 16. Temperatura da água, média dos 4 distritos estudados

Os valores de “dureza total” (DT) (Figuras 17 e 18) e “dureza carbonatada” (DC) (Figuras 19 e 20) também apresentam algumas variações ao longo do tempo. O valor máximo para a “dureza total” foi detectado nas águas colhidas no distrito de Évora e foi de 445,0 mg/l. Relativamente à “dureza carbonatada”, o valor máximo foi de 284,8 mg/l, considerando todos os distritos, com excepção do de Lisboa). Verifica-se um ligeiro aumento em ambos os parâmetros nos meses de verão.

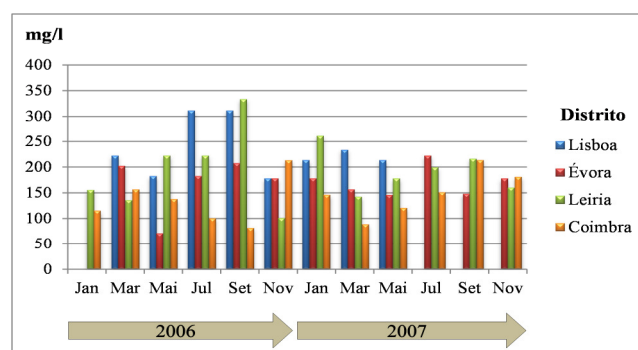


Figura 17. DT da água, média por distrito

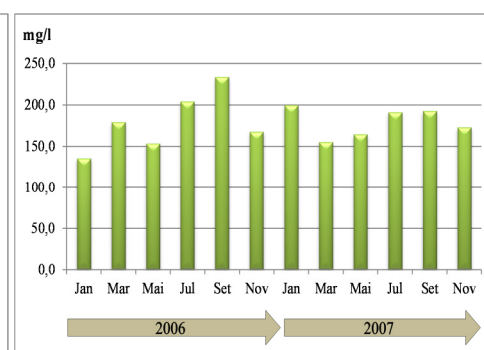


Figura 18. DT da água dos habitats, média dos 4 distritos estudados

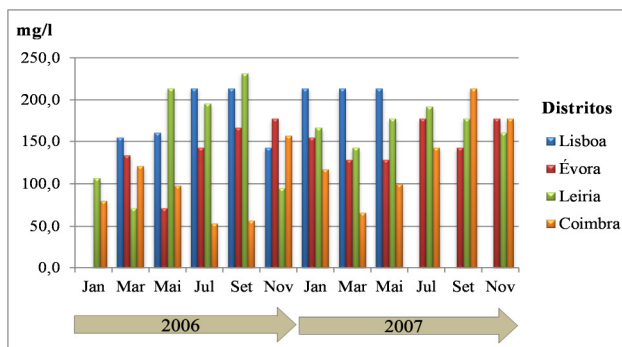


Figura 19. DC da água, média por distrito

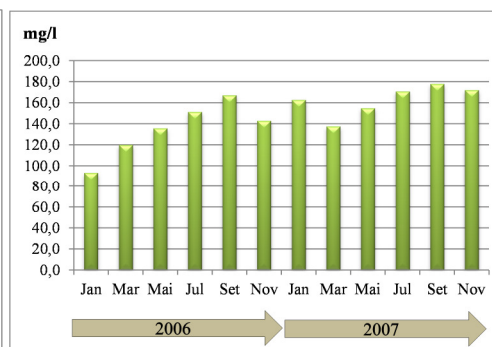


Figura 20. DC da água, média dos 4 distritos estudados

Contrariamente aos outros parâmetros estudados, é nos meses mais quentes que os valores de nitratos são inferiores, apresentando um mínimo de 0 e um máximo de 50 mg/l (distritos de Leiria e Évora) (Figuras 21 e 22).

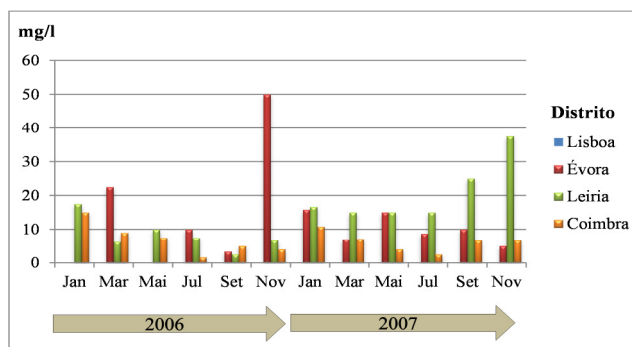


Figura 21. Concentração de nitratos na água, média por distrito

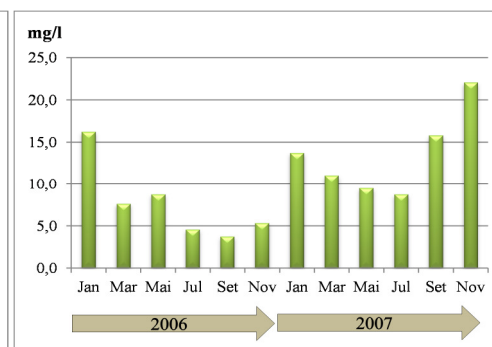


Figura 22. Concentração de nitratos na água, média dos 4 distritos estudados

Os valores de sulfatos (Figuras 23 e 24) apenas apresentaram alterações nas primeiras fases de estudo, mantendo-se praticamente constantes até final do estudo. Apresentaram um mínimo de 200 mg/l e um máximo de 400 mg/l.

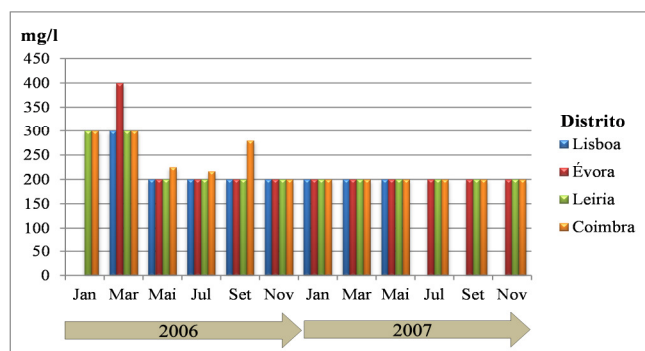


Figura 23. Concentração de sulfatos na água, média por distrito

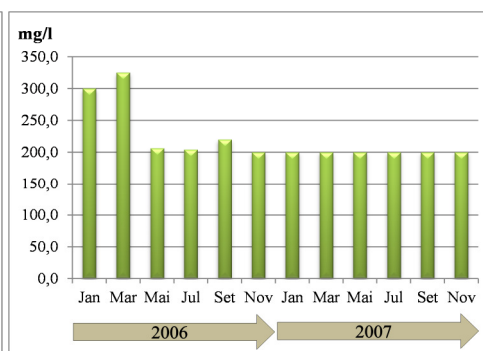


Figura 24 Concentração de sulfatos na água, média dos 4 distritos estudados

Os valores de cálcio também foram aumentando durante nos meses de verão, apresentando um máximo de 100 mg/l (em todos os distritos estudados) e diminuindo no inverno (Figuras 25 e 26).

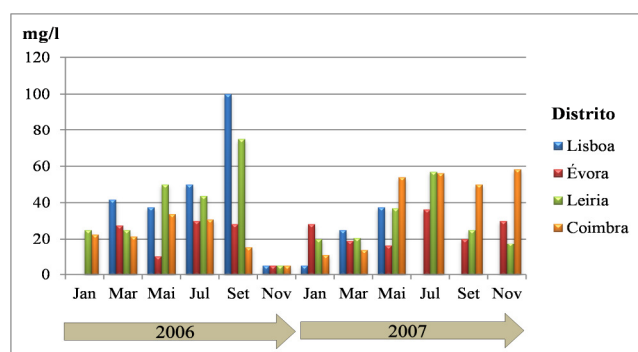


Figura 25. Concentração de cálcio na água, média por distrito

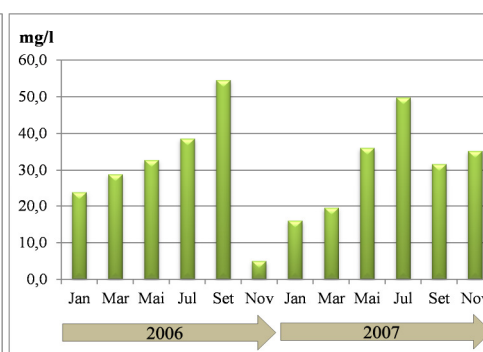


Figura 26. Concentração de cálcio na água, média dos 4 distritos estudados

Não foi encontrado nenhum dos metais doseados (cádmio, chumbo, cobre, níquel e zinco), assim como também não se encontraram vestígios de nitritos, amónio e cloro.

Relativamente ao magnésio, os valores encontrados foram demasiado baixos (todos inferiores a 100 mg/l). Uma vez que apenas deu para observar a presença de vestígios de magnésio nas tiras reactivas decidiu-se classificar apenas como presente ou ausente.

Assim, verificou-se presença de magnésio em 69,1% (num total de 105 observações) das amostras, sendo: 9,5% (10 observações) do distrito de Lisboa; 27,6%

(29 observações) do distrito de Leiria; e 31,4% (33 observações) no distrito de Coimbra e igual valor no distrito de Évora.

4.1.1.3. Moluscos colhidos

Ao todo, foram colhidos 6509 moluscos, num total de 152 observações. Em 2006 colheram-se 3465 moluscos (86 observações) e 3044 em 2007 (66 observações) (Figura 27).

No que concerne a *L. truncatula*, colheram-se 3397 moluscos, dos quais 1233 foram colhidos em 2006 e 2164 em 2007

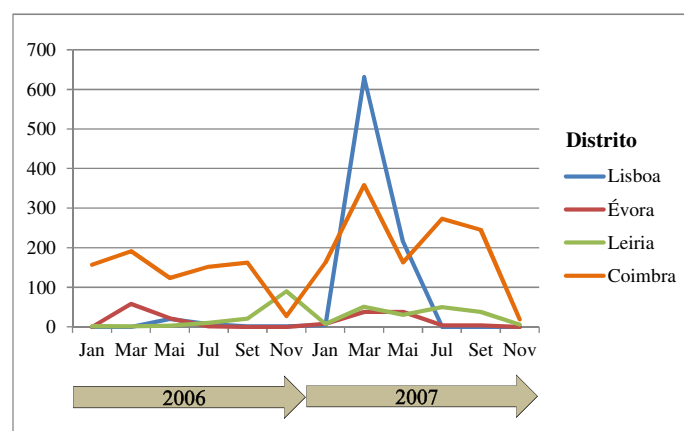


Figura 27. Número de moluscos *L. truncatula* colhidos por distrito

Além de *L. truncatula*, colheram-se ainda outras espécies de moluscos como: *Lymnaea peregra*, *Physa acuta*, *Ancylus* sp, *Planorbarius metidjensis*, *Bithynia tentaculata*, e alguns exemplares de moluscos da sub-classe Prosobranchiata (Tabela 10).

Tabela 10. Moluscos colhidos por distrito

Moluscos colhidos	Distrito Lisboa	Distrito Leiria	Distrito Coimbra	Distrito Évora	Total
<i>L. truncatula</i>	880	311	2033	173	3397
<i>L. peregra</i>	0	70	270	0	340
<i>P. acuta</i>	0	164	265	323	752
<i>Ancylus sp</i>	0	21	71	71	163
<i>P. metidjensis</i>	16	392	347	978	1733
<i>B. tentaculata</i>	0	0	6	1	7
Prosobranchiata	0	64	53	0	117
Total	896	1022	3045	1546	6509

Coimbra foi o distrito onde se colheram mais moluscos, inclusivamente da espécie *L. truncatula*.

No ano de 2007, o total de moluscos *L. truncatula* colhidos foi muito superior ao de 2006, nomeadamente nos distritos de Coimbra e Lisboa, como é possível observar na Figura 27. Este aumento do número de moluscos colhidos é mais evidente nas colheitas efectuadas no mês de Março nos dois distritos referidos (Figura 27).

Relativamente à localização dos gastrópodes *L. truncatula* no habitat, a grande maioria encontrava-se na lama, rochas ou em qualquer suporte sólido nas áreas adjacentes à colecção de água (Figura 28: a, b,c). No entanto, no distrito de Lisboa, os moluscos encontravam-se maioritariamente dentro da colecção de água (Figura 28: d)



a, b) na lama na margem do curso de água; c) fixos às folhas flutuantes na água, d) dentro do curso de água

Figura 28. Tipo de localização dos moluscos *L. truncatula* nos seus habitats, em Portugal continental

4.1.2. Caracterização dos habitats preferenciais de *L. truncatula*

A fim de caracterizar os habitats preferenciais de *L. truncatula*, efectuou-se uma análise dos vários locais estudados, onde se colheram exemplares desta espécie de gastrópodes.

Assim, os habitats foram de vários tipos, de acordo com a Tabela 11. “Ribeiro” foi o tipo de habitat mais prevalente em praticamente todos os distritos estudados (54% do total dos habitats), exceptuando no distrito de Lisboa em que todos os habitats foram do tipo “Pequeno caudal de água” (PCA).

Tabela 11. Tipos de colecções de água encontrados com presença *L. truncatula*

Tipo de habitat	Tapada Mafra	Distrito Leiria	Distrito Coimbra	Distrito Évora	Total
PCA	4 (100%)	1 (10%)	2 (22,2%)	1 (12,5%)	8 (25,8%)
Tanque	-	-	-	2 (25%)	2 (6,5%)
Ribeiro	-	8 (80%)	4 (44,4%)	5 (62,5%)	17 (54,8%)
Charco	-	1 (10%)	-	-	1 (3,2%)
CCA	-	-	3 (33,3%)	-	3 (9,7%)
Total	4	10	9	8	31

PCA – Pequeno caudal de água; CCA – Campo de cultivo de arroz

Em ambos os casos, a maioria dos habitats apresentaram carácter “Temporário” (80,6%) (Tabela 12), com vegetação na água preferencialmente “Leve” (74,2%) (Tabela 13) do tipo “Emergente e Imersa” (EMG+IMS) (41,3%) (Tabela 14).

Tabela 12. Carácter das colecções de água estudados, com presença de *L. truncatula*

Carácter do habitat	Distrito Lisboa	Distrito Leiria	Distrito Coimbra	Distrito Évora	Total
Permanente	-	3 (30%)	2 (22,2%)	1 (12,5%)	6 (19,4%)
Temporário	4 (100%)	7 (70%)	7 (77,8%)	7 (87,5%)	25 (80,6%)
Total	4	10	9	8	31

Tabela 13. Vegetação na água dos habitats estudados, com presença de *L. truncatula*

Vegetação água	Distrito Lisboa	Distrito Leiria	Distrito Coimbra	Distrito Évora	Total
Nenhuma	1 (25%)	1 (10%)	-	-	2 (6,5%)
Leve	3 (75%)	8 (80%)	5 (55,6)	7 (75%)	23 (74,2%)
Densa	-	1 (10%)	4 (44,4)	1 (25%)	6 (19,4%)
Total	4	10	9	8	31

Tabela 14. Tipo de vegetação na água dos habitats estudados, com presença de *L. truncatula*

Vegetação água	Distrito Lisboa	Distrito Leiria	Distrito Coimbra	Distrito Évora	Total
Nula	1 (25%)	2 (20%)	-	2 (25%)	5 (16,1%)
FLUT	-	-	-	-	-
EMG	-	2 (20%)	1 (11,1%)	-	3 (9,7%)
IMS	-	2 (20%)	1 (11,1%)	-	3 (9,7%)
EMG+FLUT	-	-	-	-	-
EMG+FLUT+IMS	3 (75%)	-	1 (11,1%)	2 (25%)	6 (19,4%)
FLUT+IMS	-	-	1 (11,1%)	-	1 (3,2%)
EMG+IMS	-	4 (40%)	5 (55,6%)	4 (50%)	13 (41,3%)
Total	4	10	9	8	31

FLUT–Flutuante; EMG–Emergente; IMS–Imersa

O tipo de substrato composto por “Argila + Matéria em decomposição” (ARG+MDEC) foi o mais frequente nas colecções de água, representando 22% dos resultados (Tabela 15).

Tabela 15. Tipo de substrato dos habitats estudados, com presença de *L. truncatula*

Substrato	Distrito Lisboa	Distrito Leiria	Distrito Coimbra	Distrito Évora	Total
ARG	1 (25%)	1 (10%)	-	-	2 (6,4%)
AR	-	1 (10%)	-	-	1 (3,2%)
MDEC	-	-	-	2 (25%)	2 (6,4%)
ARG+ROC	-	-	1 (11,1%)	1 (12,5%)	2 (6,4%)
AR+ARG	-	2 (20%)	-	1 (12,5%)	3 (9,6%)
ARG+HUM	-	-	-	1 (12,5%)	1 (3,2%)
ARG+MDEC	3 (75%)	-	4 (44,4%)	-	7 (22,4%)
ROC+AR	-	-	-	-	-
AR+MDEC	-	-	-	-	-
ARG+ROC+AR+MDEC	-	3 (30%)	1 (11,1%)	-	4
ARG+HUM+MDEC	-	-	-	1 (12,5%)	1 (3,2%)
ROC+AR+ARG	-	1 (10%)	1 (11,1%)	1 (12,5%)	3 (9,6%)
CIM+ARG	-	1 (10%)	1 (11,1%)	-	2 (6,4%)
AR+ARG+HUM+MDEC	-	1 (10%)	-	1 (12,5%)	2 (6,4%)
ROC+AR+HUM	-	-	1 (11,1%)	-	1 (3,2%)
ROC+AR+MDEC	-	-	-	-	-
Total	4	10	9	8	31

ARG–Argila; AR–Areia; MDEC–Matéria em decomposição; ROC–Rochas; Hum–Húmus; CIM–Cimento

Relativamente à quantidade de vegetação na margem, apesar de a maioria apresentar “Pouca” vegetação (41,3%) não parece haver grandes diferenças entre os valores obtidos (Tabela 16.). Relativamente à presença de agriões, apenas se encontraram em 9,7% dos habitats (Tabela 17).

Tabela 16. Quantidade de vegetação na margem dos habitats estudados, com presença de *L. truncatula*

Vegetação margem	Distrito Lisboa	Distrito Leiria	Distrito Coimbra	Distrito Évora	Total
Nenhuma	-	2 (20%)	4 (44,4%)	1 (12,5%)	7 (22,4%)
Pouca	1 (25%)	4 (40%)	4 (44,4%)	4 (50%)	13 (41,3%)
Muita	3 (75%)	4 (40%)	1 (11,1%)	3 (37,5%)	11 (35,5%)
Total	4	10	9	8	31

Tabela 17. Presença de agriões dentro das colecções de água estudadas, com presença de *L. truncatula*

Presença de agriões	Distrito Lisboa	Distrito Leiria	Distrito Coimbra	Distrito Évora	Total
Não	4 (100%)	7 (70%)	7 (77,8%)	7 (87,5%)	25 (80,6%)
Sim	-	3 (30%)	2 (22,2%)	1 (12,5%)	6 (9,7%)
Total	4	10	9	8	31

A maioria dos habitats de *L. truncatula* apresentaram água “Límpida” (93,5%) (Tabela 18.), “Incolor” (90,3%) (Tabela 19), “Inodora” (90,3%) (Tabela 20) e com exposição solar “Total” (90,3%) (Tabela 21),

Tabela 18. Limpeza da água dos habitats estudados, com presença de *L. truncatula*

Vegetação margem	Distrito Lisboa	Distrito Leiria	Distrito Coimbra	Distrito Évora	Total
Límpida	4 (100%)	9 (90%)	9 (100%)	7 (87,5%)	29 (93,5%)
Turva	-	1 (10%)		1 (12,5%)	2 (6,5%)
Total	4	10	9	8	31

Tabela 19. Cor da água dos habitats estudados, com presença de *L. truncatula*

Vegetação margem	Distrito Lisboa	Distrito Leiria	Distrito Coimbra	Distrito Évora	Total
Incolor	4 (100%)	9 (90%)	9 (100%)	6 (75%)	28 (90,3%)
Escura	-	1 (10%)	-	2 (25%)	3 (9,7%)
Total	4	10	9	8	31

Tabela 20. Cheiro da água dos habitats estudados, com presença de *L. truncatula*

Vegetação margem	Distrito Lisboa	Distrito Leiria	Distrito Coimbra	Distrito Évora	Total
Inodora	4 (100%)	10 (100%)	8 (88,9%)	6 (75%)	28 (90,3%)
Fétida	-	-	1 (11,1)	2 (25%)	3 (9,7%)
Total	4	10	9	8	31

Tabela 21. Tipo de exposição solar nas coleções de água estudadas, com presença de *L. truncatula*

Exposição solar	Distrito Lisboa	Distrito Leiria	Distrito Coimbra	Distrito Évora	Total
Parcial	-	-	1 (11,1%)	-	1 (3,2%)
Fraca	-	1 (10%)	-	1 (12,5%)	2 (6,4%)
Total	4 (100%)	9 (90%)	8 (88,9%)	7 (87,5%)	28 (90,3%)
Total	4	10	9	8	31

Relativamente aos doseamentos das “dureza total” (DT) e “dureza carbonatada” (DC) na água dos habitats: verificou-se um aumento da “dureza total” (DT) ao longo do ano de 2006, decrescendo só no mês de Novembro e seguidamente, após uma subida no mês de Janeiro, um decréscimo no mês de Março. Até final do estudo os valores mantiveram-se praticamente constantes (Figura 32). Em relação à “dureza carbonatada” (DC), a dinâmica dos valores foi semelhante, mas menos acentuada (Figura 33).

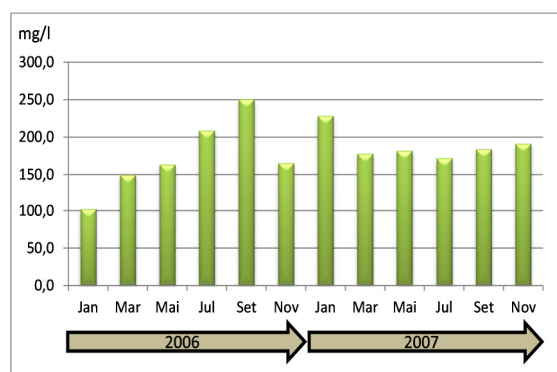


Figura 29. DT da água dos habitats com *L. truncatula*

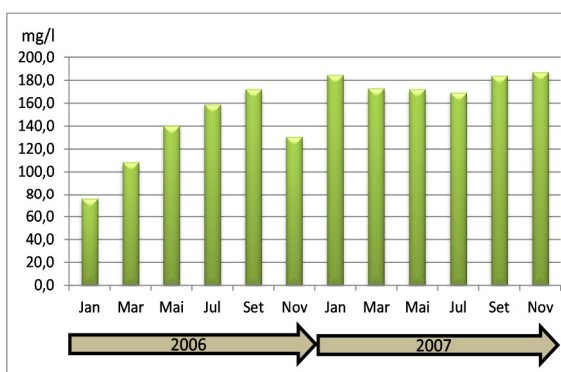


Figura 30. DC da água dos habitats com *L. truncatula*

Relativamente ao pH da água, observou-se um decréscimo de Janeiro para Março de 2006. Seguidamente, verificou-se um aumento até ao mês de Julho. Posteriormente, os valores diminuíram gradualmente até ao mês de Novembro. Em 2007, observou-se um aumento dos valores no mês de Março, decrescendo depois até Setembro. Apesar de haver diferenças, entre Julho e Novembro, estas são muito pequenas (Figura 31).

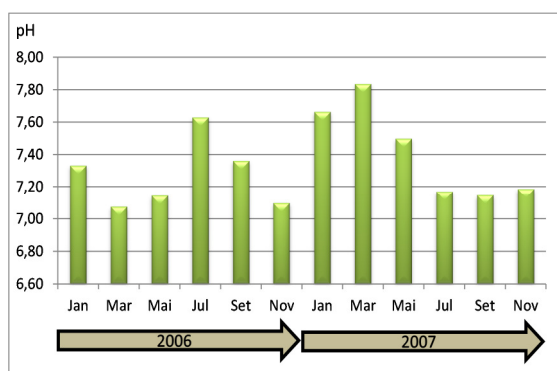


Figura 31. pH da água dos habitats com *L. truncatula*

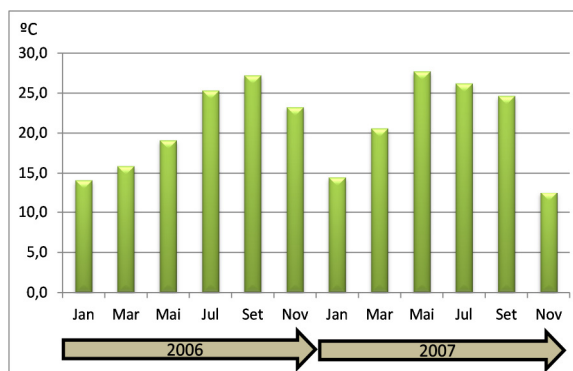


Figura 32. Temperatura da água dos habitats com *L. truncatula*

Em relação à temperatura da água, observou-se um aumento até aos meses de verão e um decréscimo à medida que se aproxima do inverno. No ano de 2007 verificou-se o mesmo, com a diferença de que observaram-se temperaturas mais elevadas na altura da primavera. Apesar disso, as temperaturas aumentaram mais rapidamente no ano de 2007, sendo o mês de maio, aquele em que se observaram

temperaturas mais altas. O aumento das temperaturas em 2006 foi mais gradual (Figura 32).

Os nitratos doseados na água dos habitats de *L. truncatula* estudados, não apresentaram qualquer correspondência entre os dois anos estudados, os valores mais elevados registaram-se no início de 2006 e no final de 2007 (Figura 33)

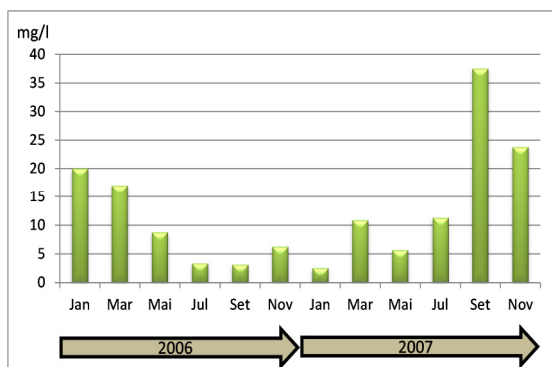


Figura 33. Concentração de nitratos na água dos habitats com *L. truncatula*

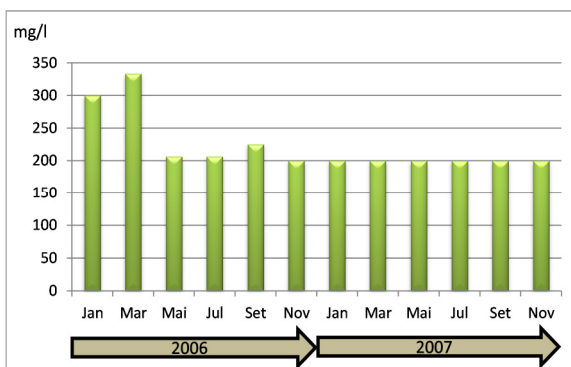


Figura 34. Concentração de sulfatos na água dos habitats com *L. truncatula*

À semelhança do que se verificou nos locais estudados em geral, também naqueles em que se colheram moluscos *L. truncatula*, os sulfatos doseados na água apresentaram valores semelhantes, observando-se um ligeiro aumento entre Janeiro e Março de 2006, registando-se seguidamente uma queda dos valores para cerca de 200 mg/l e mantendo-se assim até final do estudo (Figura 34).

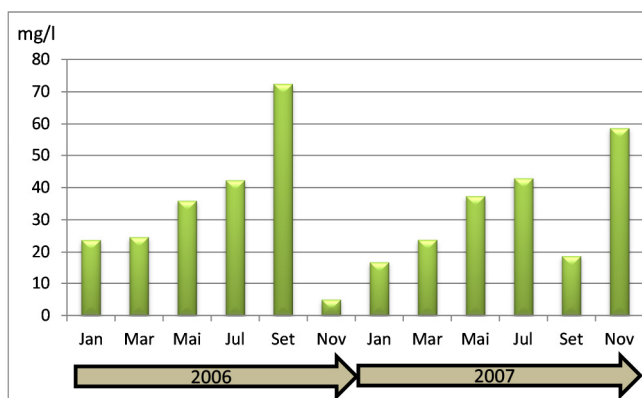


Figura 35. Concentração de cálcio na água dos habitats com *L. truncatula*

Relativamente aos valores de cálcio, a dinâmica dos valores foi semelhante nos dois anos de estudo. A única diferença registou-se nos meses de Setembro e Novembro. Em 2006 o valor máximo observou-se no mês de Setembro, seguindo-se de um decréscimo em Novembro. Em 2007, observou-se um decréscimo em Setembro, subindo novamente em Novembro (Figura 35).

4.1.3. Influência dos parâmetros físicos, físico-químicos e biológicos dos habitats na densidade populacional de *L. truncatula*

4.1.3.a. Parâmetros físicos

Parece haver uma influência directa relativamente à quantidade de vegetação aquática assim como, do substrato, presentes nos habitats, sobre o número de moluscos *L. truncatula* colhido (KW: $p=0,017$; $p=0,00$ respectivamente) (Tabela 22).

Tabela 22. Teste de Kruskal-Wallis

Parâmetro	KW	Exp. solar	Tipo de Veget. aquática	Carácter de veget. aquática	Quantidade de veget. na margem	Substrato
<i>L. truncatula</i>	p	0,096	0,132	0,017*	0,100	0,00*

* significativo para $p<0,05$;

4.1.3.b. Parâmetros físico-químicos

Relativamente aos parâmetros físico-químicos, observa-se alguma correlação negativa entre a concentração de nitratos e a densidade populacional de *L. truncatula*. Apesar de não ser significativo, apresenta um valor de p próximo de 0,05 ($\rho=-0,150$; $p=0,066$) (Tabela 23).

Tabela 23. Teste de correlação de Spearman

Parâmetro		Temperatura	pH	[nitratos]	[sulfatos]	[cálcio]	Dureza total	Dureza carbonatada
<i>L. truncatula</i>	ρ	0.014	0.132	-0,150	0.133	0.081	0.077	0.121
	p	0.865	0.106	0,066	0.103	0.325	0.345	0.140

A temperatura e o pH, não parecem evidenciar qualquer influência sobre o número de gastrópodes *L. truncatula* (Spearman: $p>0,05$) (Tabela 23).

A “dureza total” (DT) da água dos habitats parece ter alguma influência sobre os moluscos *L. truncatula* colhidos, apresentando estes uma distribuição não homogênea ao longo das classes (KW: $p=0,046$) (Tabela 24). A concentração que se mostra mais favorável ao seu desenvolvimento, situa-se na classe entre 178,1 e 267 mg/l, valores a partir dos quais o número de moluscos colhidos decresceu abruptamente, até valores próximos de zero (Figura 36).

Em relação aos nitratos, verifica-se que concentrações de nitratos na água dos habitats acima dos 25 mg/l, afectam negativamente a densidade populacional de *L. truncatula* (Figura 37).

Tabela 24. Teste de Kruskal-Wallis

Parâmetro	KW	[nitratos]	[sulfatos]	[cálcio]	Dureza total	Dureza carbonatada
<i>L. truncatula</i>	<i>p</i>	0.468	0.237	0.468	0,046*	0.207

* significativo para $p<0,05$

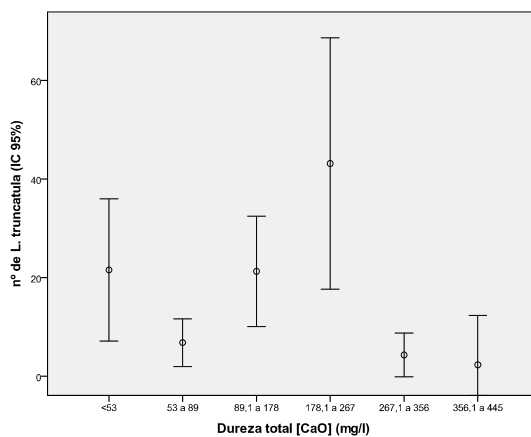


Figura 36. Variação do número de moluscos *L. truncatula* colhido em relação às concentrações de DT na água

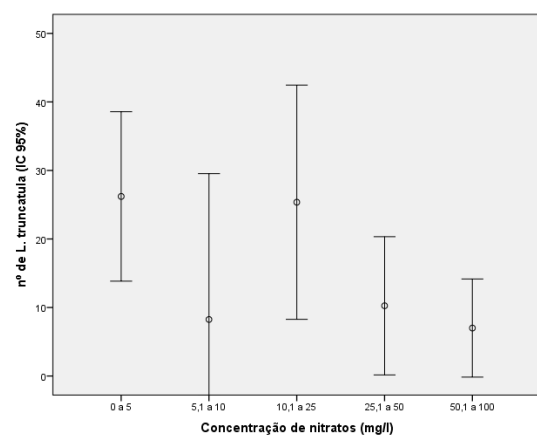


Figura 37. Variação o número de moluscos *L. truncatula* colhido em relação às concentrações de nitratos na água

No que respeita ao cálcio, o número de moluscos aumentou com valores de cálcio até aos 25,1/50mg/l, depois disso começou a decrescer (Figura 38).

Em relação à concentração de sulfatos, observou-se que os valores médios de *L. truncatula* são semelhantes com concentrações na ordem dos 300 mg/l. A partir desse valor, o número de moluscos tende a diminuir (Figura 39).

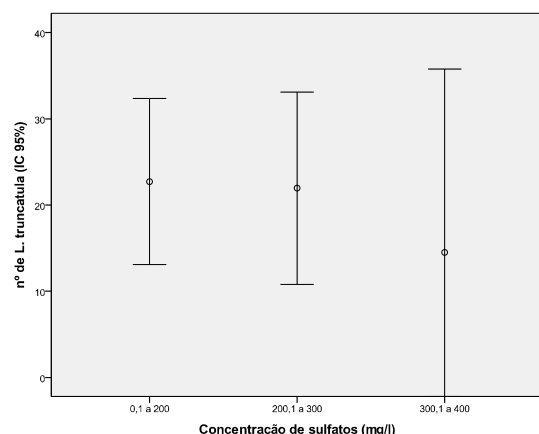


Figura 38. Variação do número de moluscos *L. truncatula* colhido em relação às concentrações de sulfatos na água

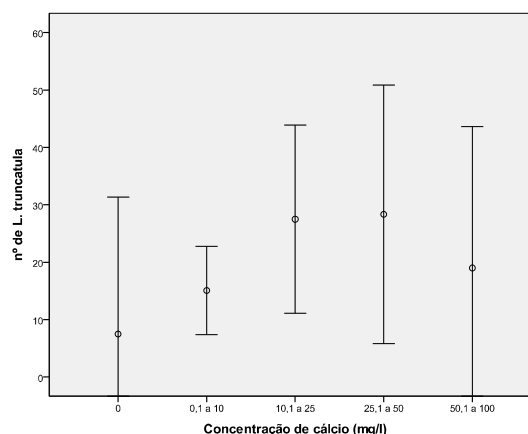


Figura 39. Variação do número de moluscos *L. truncatula* colhido em relação às concentrações de cálcio na água

4.1.3.c. Parâmetros biológicos

Enquanto a densidade populacional de *P. acuta* não parece ter influência sobre a densidade populacional de *L. truncatula*, ($\rho=0,095$; $p>0,05$) (Tabela 25), já os restantes moluscos colhidos durante o estudo mostram afectar a população de *L. truncatula*, evidenciando uma correlação negativa. Inclusive, relativamente aos moluscos da sub-classe prosobranchiata e das espécies *P. metidjensis*, *L. peregra* e, essa correlação é estatisticamente significativa (Spearman: $p=0,007$; $p=0,017$ e $p=0,000$ respectivamente) (tabela 25).

Tabela 25. Teste de correlação de Spearman

Parâmetro		<i>P. acuta</i>	<i>B. tentaculata</i>	Prosobranchiata	<i>P. metidjensis</i>	<i>L. peregra</i>	<i>Ancylus</i>
<i>L. truncatula</i>	ρ	0.095	-0.041	-0,219*	-0,194*	-0,288*	-0.127
	p	0.243	0.616	0,007	0,017	0,000	0.118

* significativo para $p<0,05$

4.2. Bioecologia de *L. truncatula* na ilha da Madeira

4.2.1. Descrição dos locais estudados e caracterização dos habitats preferenciais de *L. truncatula*

Nas duas viagens efectuadas à ilha da Madeira para trabalho de campo, foram identificadas várias colecções de água distribuídas por toda a ilha (Figura 40). Assim, foram visitados 22 locais em Julho e 31 em Novembro, tendo sido feito um total de 53 observações em 36 colecções de água diferentes.

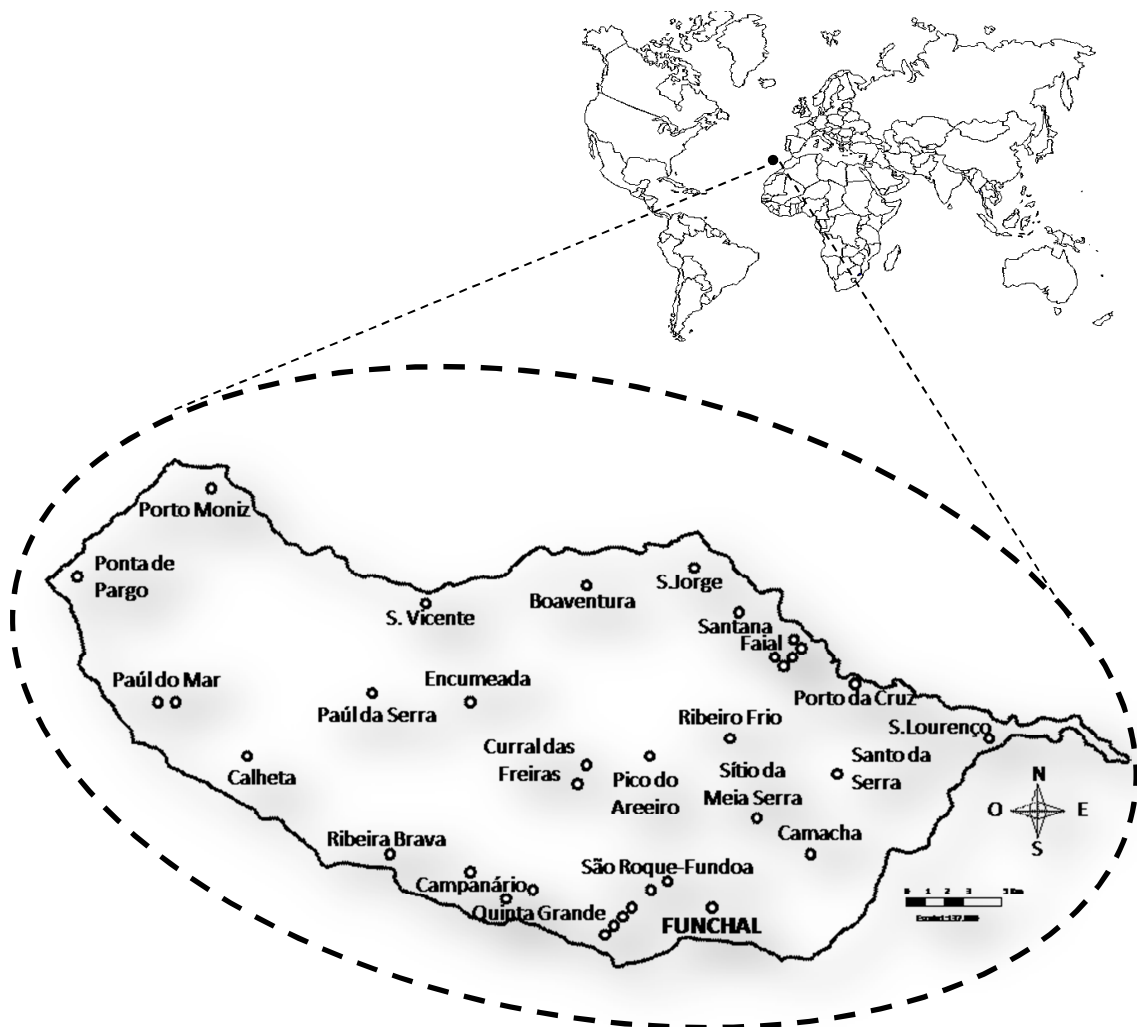


Figura 40. Mapa da ilha da Madeira evidenciando os locais de colheita de moluscos.

Os tipos de colecções de água encontrados foram: “Pequeno caudal de água” (PCA), “Ribeiro”, “Charco”, “Canal” e “Escorrimento de encosta” (EENC) Este último foi o tipo mais frequente na ilha (69,4%) (Tabela 26) (Figura 41).



Figura 41. Tipo de colecções de água estudadas na ilha da Madeira: a) Escorrimento de encosta; b) Canal; c) Pequeno caudal de água; d) Ribeiro; e) Charco

Relativamente aos locais onde se colheram *L.truncatula*, também “Escorrimento de encosta” (EENC) foi o tipo de habitat mais prevalente (79,3%) (Tabela 26).

As colecções de água estudadas eram quase todos de carácter “Permanente” (97,2%), apenas um era de carácter “Temporário”. Todos os habitats onde se colheram moluscos *L. truncatula* eram de carácter “Permanente”, com vegetação na água “Leve” (75,9%) (Tabela 27) e “Pouca” vegetação na margem (65,5%) (Tabela 28).

Tabela 26. Tipos de locais prospectados na ilha da Madeira

Tipo de habitat	Freq/Percentagem	<i>L.truncatula</i>	Outros moluscos
PCA	2 (5,6%)	2 (6,9%)	1 (4,5%)
Ribeiro	2 (5,6%)	0 (0%)	1 (4,5%)
Charco	2 (5,6%)	2 (6,9%)	2 (9,1%)
Canal	5 (13,9%)	2 (6,9%)	5 (22,7%)
EENC	25 (69,4)	23 (79,3%)	13 (59,1%)
Total	36	29 (80,6%)	22 (61,1%)

PCA-Pequeno caudal de água; EENC-Escorrimento de encosta

Tabela 27. Carácter da vegetação aquática na ilha da Madeira

Quantidade de vegetação	Nº habitats / %	Presença de <i>L. truncatula</i> / %
Nenhuma	5 (13,9%)	3 (10,3%)
Leve	27 (75%)	22 (75,9%)
Densa	4 (11,1%)	4 (13,8%)
Total	36	29

Tabela 28. Quantidade de vegetação margem das colecções de água, na ilha da Madeira.

Quantidade de vegetação	Nº habitats / %	Presença de <i>L. truncatula</i> / %
Nenhuma	7 (19,4%)	4 (13,8%)
Pouca	23 (63,9%)	19 (65,5%)
Muita	6 (16,7%)	6 (20,7%)
Total	36	29

A vegetação presente nas colecções de água foi do tipo “Emergente” (41,4%) (Tabela 29), e substrato composto por “Rochas, Argila e Matéria em decomposição” (ROC+ARG+MDEC) (33,3%) (Tabela 30). Quanto aos restantes locais estudados, os resultados foram praticamente idênticos, apenas diferindo ligeiramente nas percentagens.

Tabela 29. Tipo de vegetação na água, na ilha da Madeira.

Vegetação água	Nº habitats /%	Presença de <i>L. truncatula</i> /%
Nula	7 (19,5%)	4 (13,8%)
EMG	13 (36,1%)	12 (41,4%)
EMG+FLUT+IMS	8 (22,2%)	8 (27,6%)
EMG+IMS	8 (22,2%)	5 (17,2%)
Total	36	29

FLUT–Flutuante; EMG-Emergente; IMS-Imersa

Tabela 30. Tipo de substrato na água, na ilha da Madeira

Substrato	Nº habitats /%	Presença de <i>L. truncatula</i> /%
ARG	1 (2,8%)	1 (3,4%)
ROC	3 (8,3%)	-
ARG+ROC	11 (30,6%)	8 (27,6%)
ROC+MDEC	9 (25,0%)	8 (27,6%)
ROC+ARG + MDEC	12 (33,3%)	12 (41,4%)
Total	36	29

ARG-Argila; MDEC-Matéria em decomposição; ROC-Rochas

Observou-se ainda que os habitats apresentavam água “Incolor” e “Inodora”, com exposição solar “Frac” (55,6%), encontrando-se os moluscos *L. truncatula* que foram colhidos quer na vegetação presente na colecção de água, quer na lama a ela adjacente, ou até mesmo dentro da colecção de água (Figura 42).

4.2.1.1. Moluscos colhidos

No total, colheram-se 1409 moluscos, dos quais 874 foram identificados como *L. truncatula* (53 observações) (Figura 43; Tabela 31). Colheram-se ainda moluscos *Lymnaea* sp, *Physa acuta*, *Ancylus* sp, *Helisoma* sp e outra espécie de moluscos operculados da sub-classe Prosobranchiata.

L. truncatula foi a espécie de moluscos mais prevalente, estando presente em 80,6% dos locais estudados, tendo sido colhido igual número de exemplares em Julho e em Novembro (437 moluscos).

Os moluscos *Lymnaea* sp, serão descritos em detalhe, posteriormente, no capítulo III.

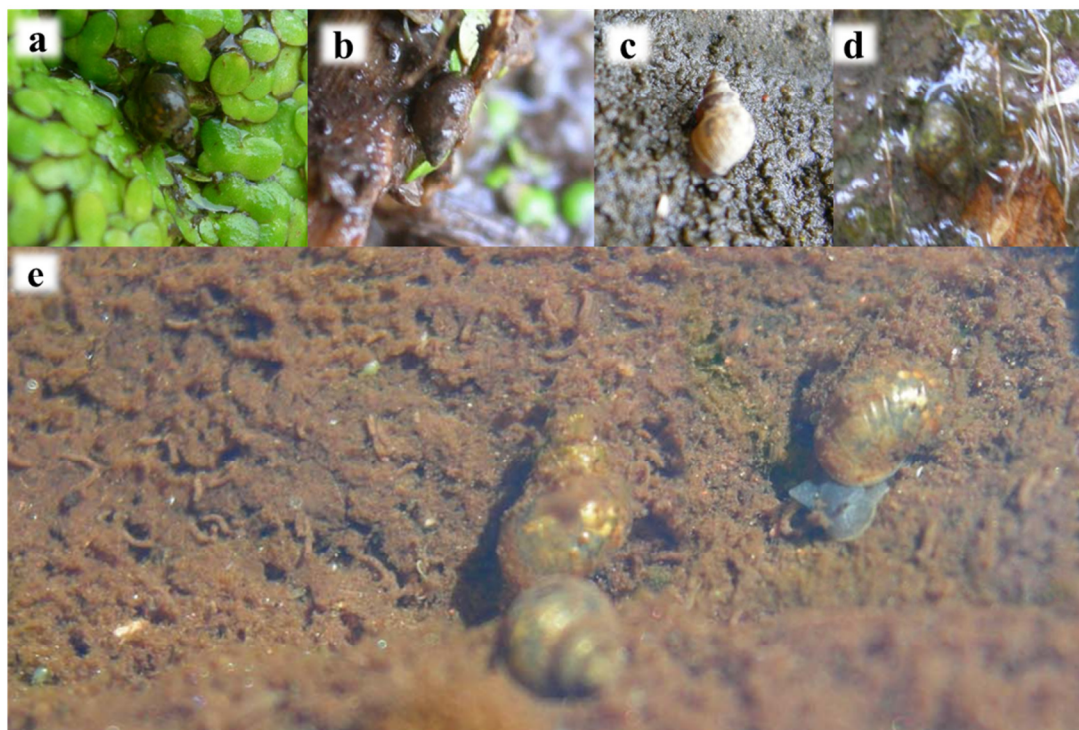


Figura 42. Tipo de localização dos moluscos *L. truncatula* nos seus habitats, na ilha da Madeira: a, b) na vegetação do habitat; c) na lama na margem da colecção de água; d, e) dentro da colecção de água.

Tabela 31. Moluscos colhidos na ilha da Madeira

Moluscos colhidos	Julho	Novembro	Total
<i>L. truncatula</i>	437 (68,9%)	437 (56,39%)	874 (62,03%)
<i>Lymnaea</i> sp	37 (5,85%)	96 (12,38%)	133 (9,45%)
<i>P. acuta</i>	68 (10,74%)	129 (16,65%)	197 (13,98%)
<i>Ancylus</i> sp	9 (1,42%)	26 (3,35%)	35 (2,48%)
<i>Helisoma</i> sp	1 (0,16%)	20 (2,58%)	21 (1,49%)
Prosobranchiata	82 (12,93%)	67(8,65%)	149 (10,57%)
Total	634 (100%)	775 (100%)	1409 (100%)

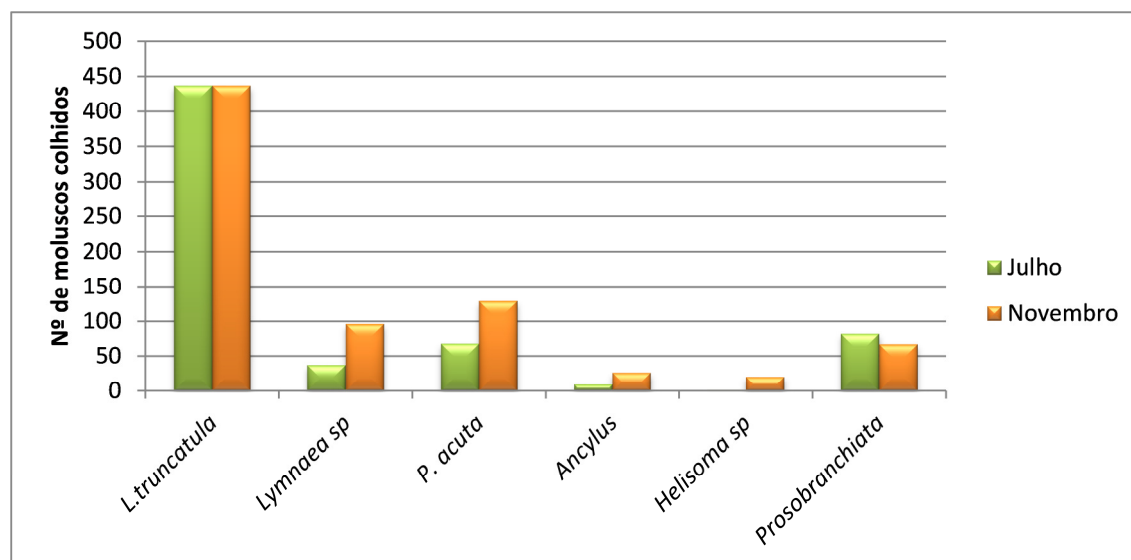


Figura 43. Número de moluscos colhidos na ilha da Madeira, em Julho e Novembro

4.2.1.2. Doseamentos efectuados nas águas dos locais estudados

No geral, em Julho, os valores de pH variaram entre 6,4 e 8,6, com uma média de 7,5, diminuindo ligeiramente em Novembro, variando entre 6,3 e 8,2, com uma média de 7,1 (Tabela 32). Relativamente aos habitats onde se colheram moluscos *L. truncatula*, também se verificou um decréscimo do primeiro para o segundo período de estudo, no entanto relativamente aos habitats em geral as diferenças foram muito pequenas.

Tabela 32. Valores de pH da água dos habitats estudados, na ilha da Madeira.

Mês	Habitats no geral			Habitats <i>L. truncatula</i>		
	Min	Máx	Média	Min	Máx	Média
Julho	6,4	8,6	7,5	6,7	8,3	7,4
Novembro	6,3	8,2	7,1	6,4	8,2	7,1

Os valores mínimos de temperatura da água dos locais estudados foram muito semelhantes quer em Julho, quer em Novembro, 10,7°C e 10°C respectivamente (Tabela 33). Relativamente aos valores máximos, houve um decréscimo de 6,3°C entre Julho e Novembro (27,2°C e 20,9°C respectivamente), observando-se também um decréscimo da temperatura média de 2,9°C.

Relativamente aos habitats de *L. truncatula*, observaram-se valores superiores da temperatura mínima em ambos os meses (14,7°C e 14,4°C), no entanto, os valores máximos de temperatura da água foram semelhantes ao geral dos locais estudados. Os

valores médios de temperatura foram ligeiramente superiores (19,6°C em Julho e 17,2°C em Novembro)

Tabela 33. Valores de temperatura da água dos habitats estudados, na ilha da Madeira (°C).

Mês	Habitats no geral			Habitats <i>L. truncatula</i>		
	Min	Máx	Média	Min	Máx	Média
Julho	10,7	27,2	19,5	14,7	27,2	19,6
Novembro	10,0	20,9	16,6	14,4	20,9	17,2

Os valores mínimos e máximos de “dureza total” (DT) na água dos locais estudados foram semelhantes nas duas fases de estudo, entre 0 e 53,0 mg/l (Tabela 34). Nos habitats de *L. truncatula*, os valores mínimos de máximos foram idênticos nas duas épocas. As medianas foram também idênticas, entre 53 e 89mg/l.

Tabela 34. DT na água dos habitats estudados, na ilha da Madeira (mg/l).

Mês	Habitats no geral			Habitats <i>L. truncatula</i>		
	Min	Máx	Mediana	Min	Máx	Mediana
Julho	53,00	178,00	89,00	53,00	178,00	89,00
Novembro	53,00	178,00	89,00	53,00	178,00	89,00

À semelhança do que se observou com a “dureza total” (DT), também os valores mínimos e máximos, assim como a mediana dos valores, de “dureza carbonatada” (DC) foram semelhantes nas duas fases de colheita, quer no geral dos habitats estudados, quer apenas naqueles onde se encontraram moluscos *L. truncatula* (Tabela 35). Os valores variaram entre 0 e 142,4 mg/l. A única exceção observada foi no geral dos habitats, o valor máximo observado em Novembro que foi superior ao observado em Julho, 178,0 mg/l. A mediana situou-se entre 0,1 e 71,2 mg/l.

Tabela 35. DC na água dos habitats estudados, na ilha da Madeira (mg/l).

Mês	Habitats no geral			Habitats <i>L. truncatula</i>		
	Min	Máx	Mediana	Min	Máx	Mediana
Julho	0,00	142,40	71,20	0,00	142,40	71,20
Novembro	0,00	178,00	71,20	0,00	142,40	71,20

Relativamente à concentração de cálcio, os valores mínimos e máximos, assim como os das medianas foram idênticos para os habitats em geral e para os de *L. truncatula* (Tabela 36), assim como nas duas fases de estudo.

Tabela 36. Concentração de cálcio na água dos habitats estudados, na ilha da Madeira (mg/l).

Mês	Habitats no geral			Habitats <i>L. truncatula</i>		
	Min	Máx	Mediana	Min	Máx	Mediana
Julho	0,00	25,00	10,00	0,00	25,00	10,00
Novembro	0,00	25,00	10,00	0,00	25,00	10,00

A concentração mínima de nitratos nos locais estudados foi idêntica nos dois períodos, Julho e Novembro, entre 0,00 e 5,00 mg/l (Tabela 37). Relativamente aos valores máximos obtidos, verificou-se uma diminuição de Julho para Novembro. Em relação aos habitats onde se encontraram moluscos *L. truncatula*, observou-se igualmente um decréscimo do valor máximo de Julho para Novembro, que foi inclusive inferior ao do observado nos habitats em geral.

Tabela 37. Concentração de nitratos na água dos habitats estudados, na ilha da Madeira (mg/l).

Mês	Habitats no geral			Habitats <i>L. truncatula</i>		
	Min	Máx	Mediana	Min	Máx	Mediana
Julho	5,00	100,00	5,00	5,00	100,00	5,00
Novembro	5,00	50,00	5,00	5,00	25,00	5,00

À semelhança do que se observou nas amostras de água do continente, também na ilha da Madeira não foi encontrado nenhum dos metais pesquisados (cádmio, chumbo, cobre, níquel e zinco), assim como também não se encontraram vestígios de nitritos, amónio e cloro. Relativamente ao magnésio, também se verificou que os valores foram demasiado baixos (inferiores a 100 mg/l) pelo que não se puderam dosear. No entanto foi possível observar a presença de vestígios (pela cor da tira reactiva) de magnésio em 46 das 53 amostras.

4.2.2. Influência dos parâmetros físicos, físico-químicos e biológicos na densidade de *L. truncatula* na ilha da Madeira

4.2.2.a. Parâmetros físicos

Também na ilha da Madeira os parâmetros físicos dos habitats não parecem influenciar a densidade populacional de *L. truncatula*, exceptuando o tipo de vegetação aquática. A distribuição de *L. truncatula* não é independente do tipo de vegetação aquática (KW: $p=0.031$) (Tabela 38).

Tabela 38. Teste de Kruskal-Wallis

Parâmetro	KW	Exp. solar	Tipo de Veget. aquática	Carácter veget. aquática	Quantidade de veget. na margem	Substrato
<i>L. truncatula</i>	p	0.291	0.031*	0.721	0.526	0.05

*significativo para $p<0,05$

4.2.2.b. Parâmetros físico-químicos

O único factor físico-químico que sugere ter influenciado a densidade populacional de *L. truncatula* foi a temperatura, verificando-se uma correlação positiva e significativa ($\rho=0,315$; $p=0,022$) (Tabela 39).

Tabela 39. Teste de correlação de Spearman

Parâmetro		Temperatura	pH	[nitratos]	[cálcio]	Dureza total	Dureza carbonatada
<i>L. truncatula</i>	ρ	0.315	0.119	0.056	0.193	0.091	0.137
	p	0.022*	0.397	0.692	0.165	0.518	0.327

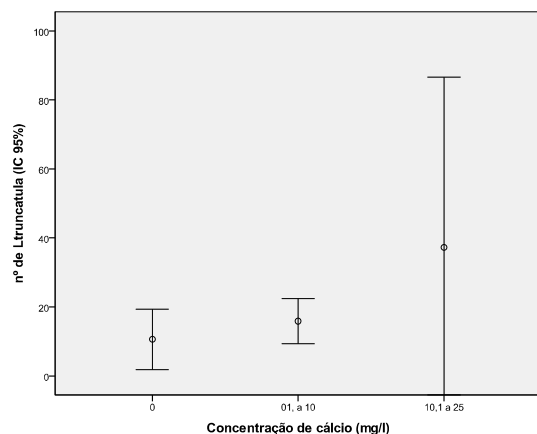
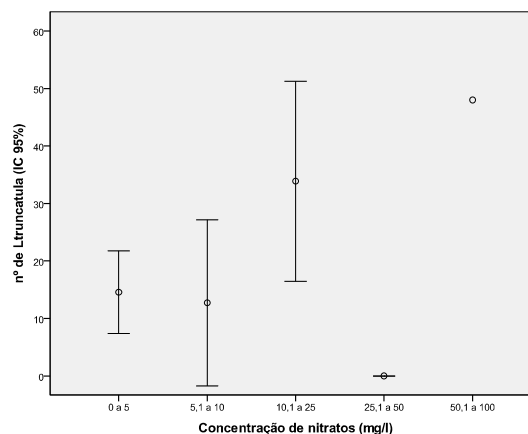
* significativo para $p<0,05$

Relativamente à concentração de cálcio na água dos habitats, verifica-se que à medida que aumenta a concentração, também aumenta a densidade populacional de *L. truncatula* (Figura 44). No entanto, estatisticamente não é significativa ($p>0,05$).

No que respeita aos nitratos, a distribuição de *L. truncatula* não é a mesma ao longo das várias classes de concentrações (KW: $p=0,002$) (tabela 40). A concentração que se mostrou mais favorável aos moluscos *L. truncatula*, situa-se entre 10,1e 25 mg/l (Figura 45).

Tabela 40. Teste de Kruskal-Wallis

Parâmetro	KW	[nitratos]	[cálcio]	Dureza total	Dureza carbonatada
<i>L. truncatula</i>	<i>p</i>	0,002*	0,213	0,286	0,298

* significativo para $p < 0,05$ Figura 44. Variação dos moluscos *L. truncatula* colhidos em relação à concentração de cálcioFigura 45. Variação dos moluscos *L. truncatula* colhidos em relação à concentração de nitratos

4.2.2.c. Parâmetros biológicos

No que respeita à relação entre as densidades de moluscos *L. truncatula*, com a de moluscos de outras espécies, observa-se uma correlação negativa, ainda que não seja estatisticamente significativa (Spearman: $p > 0,05$), com as espécies *P. acuta*, *Lymnaea* sp, *Helisoma* sp e *Ancylus* sp. (Tabela 41).

Tabela 41. Teste de correlação de Spearman

Parâmetro		<i>P. acuta</i>	<i>Lymnaea</i> sp	Prosobronchiata	<i>Helisoma</i> sp	<i>Ancylus</i>
<i>L. truncatula</i>	ρ	-0.066	-0.220	0.257	-0.243	-0.127
	<i>P</i>	0.637	0.114	0.063	0.080	0.366

* significativo para $p < 0,05$

4.3. Presença de *F. hepatica*

4.3.1. Pesquisa da eliminação de cercárias

Não se observou eliminação de qualquer tipo de cercárias, pelos moluscos.

4.3.2. Pesquisa de DNA de *F. hepatica* nos moluscos

Relativamente aos moluscos *L. truncatula*, não se observou amplificação de DNA de *F. hepatica* em nenhuma das amostras estudadas. Quanto aos moluscos *Lymnaea* sp, obteve-se uma banda de 500 pb, comum às 3 amostras estudadas. As bandas obtidas apresentaram um peso molecular um pouco superior à do controlo positivo (*F. hepatica*) (Figura 46). A sequenciação deste fragmento de DNA encontra-se em curso.

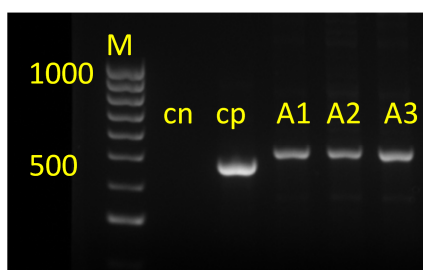


Figura 46. Fragmento de DNA amplificado, na pesquisa de *F. hepatica*, nos moluscos *Lymnaea* sp. A1,A2,A3 – amostras de moluscos *Lymnaea* sp, cn – controlo negativo; cp – controlo positivo M – marcador de peso molecular.

4.4. Pesquisa de ovos de *F. hepatica* nas fezes de animais

Foram colhidas e analisadas 20 amostras de fezes de animais, que se encontravam junto às colecções de água. Assim, 18 amostras foram colhidas na Tapada Nacional de Mafra (Distrito de Lisboa) e 2 amostras colhidas junto ao curso de água estudado em Mourão (distrito de Évora). Todas as amostras se revelaram negativas.

4.5. Pesquisa de parasitas adultos *F. hepatica* em fígados de animais

Ao todo foram analisados 5 fígados de animais provenientes da Tapada Nacional de Mafra. Dos 3 fígados de gamo (*Dama dama*), apenas 1 se encontrava parasitado, onde foi encontrado 1 parasita *F. hepatica*. Após pesquisa nos 2 fígados de javali (*Sus scrofa*) não se encontrou qualquer parasita.

5. Discussão

Nos últimos anos tem-se assistido à emergência da fasciolose em vários países da América latina, Europa, Africa e Asia. Sendo este facto considerado relacionado com as alterações climáticas. Efectivamente, os moluscos e estados larvares do parasita apresentam uma elevada dependência das características ambientais e climáticas (Bargues *et al.*, 2011a).

A diversidade de factores com influência directa sobre os habitats dos moluscos *L. truncatula*, faz da sua caracterização, uma tarefa bastante complexa. O carácter anfíbio desta espécie de moluscos e a capacidade de sobrevivência e adaptação às mais variadas condições ambientais, são factores determinantes, que se encontram na base dessa complexidade. Por outro lado, as alterações climáticas que se têm acentuado, as inconstâncias que se têm verificado ao nível da temperatura e precipitação ao longo do ano, e inclusive ao longo dos anos. Por alterações climáticas entende-se, segundo o IPCC (*Intergovernmental Panel on Climate Change*), uma “*variação estatisticamente significativa da média e/ou da variabilidade das variáveis que definem o clima e que persiste durante um período longo, tipicamente da ordem de décadas ou maior, sem identificar especificamente a causa daquela alteração*”. Estas causas, de acordo com (Santos & Miranda, 2006), podem ser naturais, antropogénicas ou resultar da conjugação das duas.

Durante os últimos anos tem-se verificado na Europa, que os fenómenos meteorológicos extremos (cheias, tempestades, secas, ondas de calor) duplicaram. Estes fenómenos têm impacte na saúde, nomeadamente nas doenças transmitidas por vectores (Santos & Miranda, 2006), ou no caso da fasciolose, por hospedeiros intermediários, moluscos *L. truncatula*, que apresentam uma relação estreita com o ambiente (Mas-Coma *et al.*, 2009, Fuentes *et al.*, 1999).

O número de moluscos *L. truncatula* colhido, apresentou algumas variações ao longo de cada ano e dos dois anos estudados. Comparando o número de moluscos colhidos em cada ano, podemos verificar que o período em que se colheu maior número de moluscos foi sempre no mês de Março, embora no ano de 2007, esse número seja muito superior. Relativamente ao número de moluscos colhidos no distrito de Coimbra, este foi condicionado principalmente por dois locais estudados, que foram o ribeiro de Soure e um “Pequeno caudal de água” (PCA) no Vale do Mondego. Relativamente ao

ribeiro de Soure, no ano de 2007 manteve um elevado número de moluscos *L. truncatula* durante praticamente todo o ano. Relativamente ao “Pequeno caudal de água” (PCA) no Vale do Mondego, este manteve sempre água durante o ano de 2006. No entanto, em Maio de 2007 o curso de água foi, provavelmente, desviado para outro local, deixando de ter água no local estudado. Nesse mês ainda se colheram moluscos que se encontravam na lama húmida, mas esta acabou por secar completamente, e deixou de ser habitat de moluscos.

Na Tapada Nacional de Mafra (Distrito de Lisboa), contrariamente ao que se tinha verificado no ano de 2007, o número de moluscos *L. truncatula* colhido foi muito superior ao do ano de 2006. A densidade de moluscos nos meses de Março e Maio foi muito elevada, já que depois desse período, as colecções de água secaram, mantendo-se assim, sem água, até final do estudo.

No distrito de Évora, a presença ou ausência de moluscos *L. truncatula* está claramente dependente da presença ou ausência de água nas colecções de água, já que em 8 habitats, 7 eram de carácter “Temporário”.

No geral dos 4 distritos estudados, é possível observar alguma tendência cíclica da prevalência de *L. truncatula* ao longo do ano. Apesar disso observam-se ainda algumas flutuações que parecem estar exclusivamente relacionadas com as condições do próprio habitat, como o que se verifica ao aproximarem-se os meses de Verão, onde alguns habitats de carácter temporário, vão secando completamente, levando ao desaparecimento dos moluscos. Devido à sua capacidade de estivação, e, após restabelecimento das condições favoráveis, voltam a repovoar o habitat (Xavier *et al.*, 1965, Mendonça & Barata, 1992). Esta característica foi igualmente observada noutras regiões do globo, com outras espécies de *Lymnaea* (Canete *et al.*, 2004).

Como já foi referido anteriormente, a capacidade anfíbia destes moluscos, está bem patente no carácter dos habitats onde se colheram moluscos *L. truncatula*.

Dos 31 habitats com *L. truncatula*, 80,6% (25) eram de carácter “Temporário”. Sendo estes na sua maioria do tipo “Ribeiro” (54,8%) e “Pequeno caudal de água” (PCA) (25,8%) estando portanto muito dependentes da água das chuvas, chegando mesmo a secar totalmente no final da Primavera e início do Verão.

Em Portugal, cerca de 42% da precipitação anual ocorre no Inverno, 6% no Verão. Os restantes 52% ocorrem nas estações intermédias, como o Outono e

Primavera. No entanto, a distribuição inter-anual é muito variável. Temos como exemplo o Inverno do ano 2000, que foi o 3º mais chuvoso dos últimos 30 anos, enquanto o ano de 2001, foi o 5º mais seco dos mesmos 30 anos (Santos & Miranda, 2006).

A temperatura do ar é outro dos factores com influência directa nos habitats dos moluscos. Além de condicionar a temperatura da água dos habitats, tem influência na evaporação da mesma. Este é um parâmetro que tem vindo a alterar-se ao longo dos anos. Desde o início do século XX, a temperatura global sofreu um aumento de 0,6°C, sendo que 0,4°C aumentaram desde a década de 70. Nos últimos anos, tem-se observado uma tendência de aumento da temperatura mínima superior ao da temperatura máxima, resultando numa diminuição da amplitude térmica (Santos and Miranda, 2006). O aquecimento global parece ser um dos factores que pode condicionar a distribuição geográfica de muitas espécies de tremátodes, devido à presença ou ausência dos seus hospedeiros intermediários, e até pelo estabelecimento de condições favoráveis à infecção dos mesmos (Mas-Coma *et al.*, 2008).

A temperatura mínima dos habitats com *L. truncatula* foi de 8°C e observou-se no distrito de Leiria, enquanto a temperatura máxima foi de 31,6°C, também no Distrito de Leiria.

Em Portugal, o efeito da temperatura, parece ser um factor menos limitante, para a distribuição de *L. truncatula* e consequentemente para a disseminação da fasciolose, do que nos países do norte da Europa. Apesar dos verões serem geralmente secos, os invernos são húmidos, permitindo o repovoamento dos moluscos (Ollerenshaw & Smith, 1969). Segundo (Abrous *et al.*, 1999), a temperatura tem influencia directa na ecologia do molusco, e no caso de infecção por tremátodes, influencia indirectamente o desenvolvimento larvar dentro do molusco. O intervalo de 8°C-31,6°C é mais amplo do que o descrito por outros autores para os habitats de *L. truncatula* (Grácio, 1983, Grácio, 1985, Euzeby, 1970), mas enquadrado com valores obtidos noutros estudos com outras espécies de *Lymnaea* (Aziz & Raut, 1996). No entanto, este parâmetro está muito dependente da hora da colheita dos moluscos e respectivamente do registo da temperatura, dado que a temperatura do ar oscila durante o dia, condicionando a temperatura da água.

A maioria dos habitats de *L. truncatula* (90,3%) apresentaram exposição solar “Total”, o que está de acordo com a literatura. Este facto deve-se à necessidade da luz solar para o desenvolvimento de algas clorofíceas, a sua principal fonte de alimentação (Paraense, 1983, Euzeby, 1970).

A vegetação na água era preferencialmente “Leve” (74,2%), tal como o descrito por Mendonça (1992a). Nos distritos de Lisboa, Leiria e Évora estes valores estiveram entre os 75% (Lisboa e Évora) e os 80% (Leiria), à excepção do distrito de Coimbra, em que a percentagem foi apenas de 55,6%. Isto deve-se, essencialmente, à presença de *L. truncatula* em “Campo de cultivo de arroz” (CCA) e a forma como é feita a cultura, do arroz, com vegetação densa, já que esta é, praticamente, a única espécie de planta no habitat. A distribuição do número de moluscos *L. truncatula* colhidos não foi a mesma nas 3 categorias definidas para o carácter da vegetação (KW: $p < 0.05$)

Exceptuando o distrito de Lisboa, em que o tipo de vegetação aquática era maioritariamente “Emergente, Flutuante e Imersa” (EMG+FLUT+IMS) (75%), nos outros distritos predominou a vegetação do tipo “Emergente e Imersa” (EMG+IMS). Não seria de esperar vegetação “Flutuante” nos habitats de *L. truncatula*, dado que impede a passagem da luz solar. Na verdade, e apesar da existência deste tipo de vegetação, este não parece ser um factor limitativo, uma vez que nos habitats em que havia vegetação (75%) esta era de carácter “Leve”. Por outro lado, a profundidade do curso de água era muito baixa, máximo de 10 cm, fazendo com que os moluscos se encontrassem aderentes à vegetação flutuante ou no substrato.

Relativamente ao substrato, “Matéria em decomposição e Argila” (MDEC+ARG) foi o mais frequentemente encontrado, tal como o descrito por (Paraense, 1983), para outras espécies lymnaeídicas.

A maioria dos habitats onde se colheram moluscos *L. truncatula*, apresentavam água “Límpida”, “Incolor” e “Inodora”, o que está de acordo com o descrito por Grácio em 1985.

Em relação à presença ou não de agriões, a usual fonte de contaminação humana, apenas se observou em 9,7% dos habitats.

Não se verificou eliminação de cercárias por parte dos moluscos colhidos, no entanto isto não significa que não estivessem infectados, sobretudo porque se verificou a presença de um fragmento de DNA amplificado (comum às três amostras), através da

PCR. Vários factores podem estar na origem deste achado. Pode ter acontecido que a infecção estivesse na fase pré-patente, não havendo, portanto, eliminação de cercarias. Por outro lado, a eliminação de cercarias não é um processo contínuo, e inclusive nem todos os miracídios se desenvolvem em cercárias, ficando muitos deles sob a forma de rédias ou outras fases larvares, nos tecidos dos moluscos (Abrous *et al.*, 2000). Assim, é possível detectar DNA do parasita no molusco, sem que se observe eliminação de cercárias.

Os moluscos *L. truncatula* podem habitar águas com intervalo de valores de dureza, bastante amplo (Manga-Gonzalez *et al.*, 1991). Segundo (Abílio & Watanabe, 1998), os moluscos lymnaeídicos apresentam preferência por águas duras, com valores de dureza na ordem dos 300mg/l. No entanto isto pode ser um pouco controverso, pois (Mendonça, 1992b), em estudos realizados na ilha de S. Miguel, no arquipélago dos Açores, verificou que a maior frequência de *L. truncatula* ocorria em águas cuja dureza, nomeadamente a dureza de carbonatos, era relativamente baixa (entre 24,9 e 115,7 mg/l). O intervalo dos valores obtidos no nosso estudo para a dureza total, em habitats com moluscos *L. truncatula*, situou-se entre os 0 e os 445mg/l de óxido de cálcio, com uma mediana entre 89 e 178mg/l. Os distritos de Lisboa e Leiria foram aqueles que apresentaram medianas mais elevadas, na classe entre 178,1 e 267mg/l. No geral, concentração que parece mais favorável ao desenvolvimentos dos moluscos *L. truncatula*, situou-se na classe entre 178,1e 267 mg/l (KW: $p < 0,05$)

Relativamente à dureza carbonatada, foram colhidos gastrópodes *L. truncatula* em habitats com concentrações que oscilaram entre 0 e 213,6mg/l de CaCO_3 , com uma mediana entre 142,4 e 178mg/l. À semelhança do que se verificou com a dureza total, os distritos de Lisboa e Leiria foram os que registaram medianas mais elevadas.

Quanto aos sulfatos, observaram-se valores até 400 mg/l SO_4^{2-} , com uma mediana entre 0 e 200 mg/l. Comparativamente ao observado por Ferreira *et al.* (2004), alguns valores obtidos por nós são muito superiores. No entanto, 300 mg/l parece ser a concentração até à qual os moluscos *L. truncatula* apresentam uma boa tolerância, já que a partir desse valor o número de moluscos tende a diminuir. Como foi referido anteriormente, a maioria dos habitats são de carácter temporário, muitos deles dependentes da água da chuva e do escoamento dessa mesma água, formando assim a colecção de água. Assim, e uma vez que estes valores elevados se registaram no distrito

de Évora, em áreas de forte actividade agrícola, pensa-se que esses valores obtidos possam resultar do acumular de substâncias, possivelmente derivadas dessa mesma actividade, como fertilizantes e pesticidas (Arner *et al.*, 2009).

Os nitratos apresentaram valores distribuídos pelas várias classes consideradas, no entanto a mediana encontrou-se na classe mais baixa, entre 0 e 5 mg/l. Os valores mais elevados registaram-se no distrito de Leiria. No total, os valores não ultrapassaram os 100 mg/l em nenhuma fase do estudo. Apesar de não se encontrar um valor estatisticamente significativo para a correlação entre a quantidade de moluscos *L. truncatula* colhidos e a concentração de nitratos nos habitats, verifica-se uma correlação negativa com um valor de p , próximo de 0,05 ($p = -0,150/p = 0,066$). A concentração mais favorável para os moluscos *L. truncatula* parece ser, entre 10,1 e 25mg/l. A partir desse valor, à medida que a concentração de nitratos aumenta, o número de moluscos tem tendência a diminuir (Figura 37).

O teor de nitratos é um parâmetro importante a estudar, assim como o cloro e a amónia. Sabe-se que valores muito elevados destas substâncias são prejudiciais ao desenvolvimento dos moluscos lymnaeídeos, provocando malformações das formas embrionárias e posteriormente a morte (Arner *et al.*, 2009).

Segundo (Euzeby, 1970), valores de cloro superiores a 50 mg/ impossibilitam a sobrevivência de *L. truncatula*. A amónia é uma das substâncias que entra em alguns compostos com actividade moluscicida (Vasileva, 1960, Morley, 2010). Não foram doseadas quaisquer concentrações de amónia nem de cloro na água dos habitats estudados.

O cálcio é um elemento fundamental na constituição da concha dos moluscos, ligado ao ião carbonato (Marxen & Becker, 2000, Malek & Cheng, 1974, Euzeby, 1970, Mendonça, 1992b). Relativamente resultados obtidos com este parâmetro, parece verificar-se um aumento da concentração, à medida que os habitats vão diminuindo o caudal. Os valores variaram entre os 0 e os 100 mg/l, sendo que a mediana se situou entre os 10 e os 25mg/l. Não se observou qualquer significado estatístico entre os valores de cálcio obtidos e o número de moluscos colhidos ao longo do estudo. No entanto, o número de moluscos parece aumentar até valores de cálcio na ordem dos 25,1/50mg/l, depois disso começaram a decrescer (Figura 39).

O pH apresentou algumas variações ao longo do estudo, com valores desde 6,1 até 9,15, amplitude obtida no distrito de Coimbra. O valor da mediana foi de 7,37. Estes valores enquadram-se nos descritos por Ferreira *et al.* (2004). A menor amplitude verificou-se na Tapada Nacional de Mafra (distrito de Lisboa): variando entre 6,68 e 7,88. Valores estes um pouco inferiores aos observados por (Barata, 1987 (1989)): 4,5/8, em estudos efectuados no mesmo local.

Não foi detectada a presença de metais pesados como: cobre, chumbo, cádmio, níquel e zinco.

Comparando este estudo com outro efectuado por Rombert e Grácio, 1984, podemos verificar que o número de habitats de *L. truncatula* (18 em Coimbra; 17 em Évora e 25 em Leiria) diminuiu bastante (9 em Coimbra; 8 em Évora e 10 em Leiria). Muitos podem ser os factores que têm contribuído para esta diminuição. No entanto, a construção tem aumentado muito nos últimos anos, diminuindo a área de pastagem, por conseguinte, diminuindo os habitats dos moluscos. Além do mais, muitos habitats podem não ter sido detectados devido a inacessibilidade. Muitas colecções de água, possíveis biótopos de *L. truncatula* assim como de outros moluscos, localizam-se dentro de propriedades privadas e vedadas não nos sendo possível ter acesso a elas.

Além de *L. truncatula*, foram colhidos moluscos de outras espécies nos habitats estudados, ao longo dos dois anos de estudo. Assim, colheram-se exemplares pertencentes às espécies *L. peregra*, *P. acuta*, *Ancylus* sp, *P. metidjensis*, *B. tentaculata*, e outros moluscos da sub-classe Prosobranchiata. A quantidade de moluscos das espécies *L. peregra*, *P. metidjensis* e da subclasse Prosobranchiata, evidenciam uma influência negativa no número de moluscos *L. truncatula* nos habitats estudados ($p = -0,288$; $-0,194$; $-0,150$ respectivamente; $p < 0,05$). Este facto pode ser explicado pela competição entre as várias espécies dentro do habitat. A competição biológica entre moluscos, quer pelo alimento, quer pelo carácter invasivo é um assunto amplamente descrito ao longo do tempo (Barbosa *et al.*, 1983, Fernandez *et al.*, 2001, Amarista *et al.*, 2001, Riley *et al.*, 2008, Giovanelli *et al.*, 2002, Brönmark *et al.*, 1991).

Relativamente à ilha da Madeira, encontraram-se condições completamente diferentes do continente.

Detentora de uma orografia bastante acidentada, com altitudes oscilando entre o nível do mar e os 1.862 m (Pico Ruivo) / 1.818 m (Pico do Areeiro), a ilha possui

diversos micro-climas devidos ao relevo, assim como à exposição aos ventos predominantes. A amplitude térmica é baixa, com poucas variações durante todo o ano mantendo-se o clima ameno com temperaturas médias a rondar os 22°C (máxima) e os 16°C (mínima). A temperatura da água do mar, devido à influência da corrente quente do Golfo, mantém-se nos 22°C no Verão, arrefecendo gradualmente até atingir os 17°C no fim do Inverno.

O clima e o exotismo da vegetação, fazem da ilha um ponto de atracção para o turismo, principal actividade da região (Madeira, 2012).

A grande quantidade e a variedade de colecções de água é uma constante ao longo da ilha (França & Almeida, 2003), O que faz com que se formem vários “Escorrimentos de encosta” (EENC) ao longo da ilha. Este foi o tipo de colecções de água predominante na ilha (69,4%). Outro tipo de colecções de água predominante na ilha da Madeira são as “Levadas”, que se situam à volta da montanha, construídas com o objectivo de levar água desde as encostas a norte até aos terrenos agrícolas da costa sul. Segundo (Mendonça, 1992a), em estudos efectuados na ilha de S. Miguel, nos Açores, neste tipo de colecções de água, com velocidade moderada da água, os moluscos localizam-se habitualmente um pouco acima do caudal de água, entre 3 e 5 cm. No entanto devido ao caudal e velocidade excessiva da água, observados nas levadas da ilha da Madeira, não se encontraram moluscos, pelo que se optou não os incluir no estudo. Pensamos que a falta de estabilidade possa estar na origem da ausência dos moluscos. É, no entanto, possível que existam pontos específicos destes cursos de água em que o caudal seja inferior, mas isso implicaria um estudo mais alargado, em locais que nos foram inacessíveis.

Ao contrário do verificou no continente, as colecções de água onde se colheram moluscos *L. truncatula*, eram quase todos de carácter “Permanente” (97,2%). As colecções de água apresentaram um substrato composto por “Rochas, Argila e Matéria em decomposição” (ROC+ARG+MDEC), com vegetação “Leve” do tipo “Emergente”, e com “Pouca” vegetação na margem. A água era “Incolor” e “Inodora”, e apresentava “Frac” exposição à luz solar. Relativamente aos locais preferenciais dos moluscos no seu habitat, não se observaram alterações relativamente ao encontrado no continente: fixos à vegetação presente no curso de água, na lama adjacente às mesmas e/ou até mesmo dentro da colecção de água.

À semelhança do encontrado no continente, colheram-se, além de *L. truncatula*, *P. acuta*, *Ancylus* sp, *Helisoma* sp, outra espécie de moluscos operculados da sub-classe Prosobranchiata e outra espécie de *Lymnaea*, que denominámos por *Lymnaea* sp. Esta espécie encontra-se descrita detalhadamente no capítulo III.

Relativamente aos registos efectuados no local, na água, os habitats apresentavam valores de pH entre 6,35/8,3 e temperatura entre 14,4°C/27,2°C. Estas diferenças de temperatura observaram-se em períodos diferentes de colheita, no entanto é possível observar diferenças semelhantes no mesmo período de colheita, devido aos vários microclimas já descritos. De Julho para Novembro verificou-se uma diminuição das temperaturas máximas, mas as mínimas mantiveram-se (valor mínimo 14,4°C). Apesar de se terem estudado colecções de água com temperaturas na ordem dos 10°C/10,7°C (no Ribeiro Frio e Pico do Areeiro), não se colheram moluscos abaixo dos 14,4°C. Este parâmetro foi o único que apresentou resultados estatisticamente significativos (Spearman: $p < 0,05$), demonstrando que à medida que a temperatura aumenta, aumenta o número de moluscos *L. truncatula*.

A “dureza total” (DT) da água dos habitats não apresentou variações nos extremos (máximo e mínimo) entre Julho e Novembro. Os valores situaram-se entre 0 e 178mg/, com uma mediana entre 53 e 89 mg/l. Estes valores foram bastante inferiores aos observados no continente, 0,00/445 mg/l com uma mediana entre 89/178 mg/l.

Relativamente à “dureza carbonatada” (DC), Os valores foram também inferiores aos observados no continente. O valor máximo encontrado nos habitats onde se colheram *L. truncatula* estava entre 71,3 e 142,4 mg/l, com mediana entre 0,1 e 71,2 mg/l, enquanto no continente esteve entre 178 e 213,6 mg/l com mediana entre 142,4 e 178 mg/l.

A concentração de nitratos apresentou um decréscimo do primeiro para o segundo período estudado, com resultados semelhantes aos observados no continente. No segundo período não se encontraram moluscos *L. truncatula* em habitats com concentrações de nitratos acima dos 25mg/l. Os valores da mediana situaram-se sempre abaixo dos 5 mg/l.

Relativamente ao cálcio, os valores foram semelhantes em Julho e Setembro, com medianas idênticas. Comparativamente aos resultados obtidos nos 5 distritos estudados no continente, e onde se colheram moluscos *L. truncatula*, as concentrações

de cálcio foram inferiores. Como a concentração de cálcio variou entre 0 e 25 mg/l não foi possível saber como seria a densidade populacional desta espécie de moluscos, com concentrações superiores, já que parece que o nº de moluscos tende a aumentar com o aumento da concentração de cálcio (Figura 44). Esta tendência é semelhante à observada nos habitats estudados no continente. No entanto, no continente esta tendência foi observada até concentrações de cálcio na ordem dos 25,1/50 mg/l, depois disso o número de moluscos diminuiu.

Praticamente todos doseamentos efectuados na ilha da Madeira apresentaram valores inferiores aos observados no continente, sem grandes oscilações entre os dois períodos estudados. O que se observou no continente é que alguns parâmetros foram alterando, ao longo do tempo, assim como os caudais das colecções de água também iam sofrendo alterações, acabando por secar. Na ilha da Madeira isso não se verificou. Pensamos que o facto de os habitats serem quase todos de carácter “Permanente”, o fluxo contínuo de água possa contribuir para a manutenção das características da água. São sim, na sua maioria águas com menos grau de dureza quer total quer de carbonatos apresentando valores de nitratos e cálcio inferiores aos das regiões do continente estudadas.

O facto de não se encontrarem diferenças estatisticamente significativas entre o número de moluscos colhidos e grande parte dos parâmetros físico-químicos estudados encontra-se de acordo com o descrito por Moens (1981), evidenciando a capacidade que esta espécie de moluscos possui, de tolerar um espectro bastante amplo destes parâmetros.

À semelhança do verificado no continente, também na ilha da Madeira se observa uma correlação negativa entre o número de moluscos *L. truncatula* colhidos e o número de moluscos de outras espécies presentes, nomeadamente *P. acuta* e *Lymnaea* sp ($\rho = -0,066$ e $\rho = -0,220$ respectivamente), sugerindo uma competição entre as espécies de moluscos. No entanto, neste caso os resultados não foram estatisticamente significativos ($p > 0,05$).

6. Conclusões

Os resultados obtidos neste estudo, fornecem-nos uma boa indicação relativamente às preferências ecológicas de *L. truncatula*, sobre a forma como a variação ao longo do tempo, dos vários factores, quer físicos, físico-químicos e biológicos, que podem influenciar ou não densidade populacional de *L. truncatula*. No entanto, uma vez que a escolha dos locais estudados foi feita por conveniência, não podemos inferir sobre o que pode ou não estar na origem da presença ou ausência dos moluscos *L. truncatula*, nem permite a criação de modelos matemáticos preditivos.

Pensamos que a escolha de métodos semi-quantitativos é demasiado redutora para este tipo de estudos, dado que a amplitude das classes é demasiado elevada, não detectando assim variações mais pequenas. Esta pode também ser uma razão para a falta de significância estatística observada em alguns casos.

Com base nos dados obtidos, não nos parece que a evolução ou alteração dos parâmetros estudados tenha influência directa sobre o maior ou menor número de moluscos colhidos ao longo dos dois anos de estudo. Talvez possa haver diferença, na comparação com as colecções de água que não constituem sequer habitat, ou seja, em que não existam moluscos. Para isso teriam que se escolher habitats de forma aleatória numa dada região e segui-los durante um período de tempo como neste estudo, com um menor intervalo de tempo para tentar perceber a diferença entre eles e os estudados, onde se encontraram moluscos.

As flutuações sazonais observadas no número de moluscos colhidos, podem ser explicadas pelas alterações da temperatura do ar, levando à seca dos habitats, com redução das condições favoráveis ao desenvolvimento do molusco, condicionando a presença ou ausência dos moluscos (Radev *et al.*, 2004). O aumento da temperatura da água, fenómeno que está dependente da temperatura do ar, pode condicionar o número de moluscos colhidos, uma vez que a este aumento corresponde uma tendência para a evaporação da água e consequentemente o desaparecimento dos moluscos.

Relativamente aos habitats estudados no continente, podemos concluir que os habitats onde se encontraram moluscos *L. truncatula* foram predominantemente: tipo “Ribeiro” de carácter “Temporário”, com “Pouca” vegetação na margem, vegetação “Leve” nas colecções de água e do tipo “Emergente e Imersa”, com substrato composto

por “Argila e Matéria em decomposição” e com água “Límpida”, “Incolor” e “Inodora”. Quanto à densidade populacional de *L. truncatula* parece ser:

- a) Influenciada pelo carácter da vegetação presente na água dos habitats, havendo uma preferência pela vegetação “Leve”;
- b) Afectada negativamente pela concentração de nitratos, diminuindo à medida que os valores de nitratos aumentam;
- c) Influenciada pelas concentrações de sulfatos e de dureza total na água, com os valores preferenciais entre 200,1 e 300 mg/l e entre 178,1/267 mg/l respectivamente;
- d) Influenciada positivamente pela concentração de cálcio na água até valores na ordem dos 25,1/50 mg/l. Concentrações superiores parecem ser prejudiciais ao desenvolvimento dos moluscos;
- e) Afectada negativamente por outras espécies de moluscos presentes, como *P. metidjensis*, *L. peregra* e moluscos da subclasse Prosobronchiata.

No caso da ilha da Madeira, podemos concluir que os habitats onde se encontraram moluscos *L. truncatula* foram predominantemente: tipo “Escorrimento de encosta” de carácter “Permanente”, com “Frac” exposição solar, com “Pouca” vegetação na margem, vegetação “Leve” nas colecções de água e do tipo “Emergente”, com substrato composto por “Rocha, Argila e Matéria em decomposição” e com água “Límpida”, “Incolor” e “Inodora”. A densidade populacional de *L. truncatula* parece ser:

- a) Influenciada pelo tipo da vegetação presente na água dos habitats;
- b) Condicionada pela temperatura da água, não se encontrando moluscos em temperaturas abaixo dos 14,4°C;
- c) Afectada negativamente pela concentração de nitratos na água, diminuindo à medida que os valores de nitratos aumentam;
- d) Favorecida com o aumento das concentrações de cálcio na água.

Não se observou eliminação de cercarias de *F. hepatica*, nem de qualquer outro trematode por parte dos moluscos colhido quer no continente quer na ilha da Madeira. A pesquisa de DNA de *F. hepatica*, por PCR, nos moluscos *L. truncatula* revelou-se negativa. Quanto aos moluscos *Lymnaea* sp, obteve-se amplificação de um fragmento de DNA, comum às 3 amostras estudadas, cuja sequenciação se encontra em curso.

A análise de fezes de animais, presentes junto às colecções de água, foi negativa em todas as amostras.

Foi encontrado um parasita *F. hepatica* no fígado de um gamo da Tapada Nacional de Mafra (distrito de Lisboa).

Capítulo II

Caracterização genética dos
moluscos *Lymnaea truncatula*

1. Introdução

1.1. Considerações gerais

Alguns problemas taxonómicos surgiram pelo facto de existirem algumas espécies morfológicamente muito semelhantes a *L. truncatula*. Por exemplo, as diferenças morfológicas observadas em espécies muito próximas de *L. truncatula*, como é o caso de *L. humilis* Say, 1822 na América do Norte, assim como de *L. cubensis* nas Américas do Norte e Central e no Caribe, não permitem uma clara distinção e consequentemente um agrupamento sistemático correcto (Jabbour-Zahab *et al.*, 1997). A variação intraespecífica da morfologia da concha é bastante marcada dentro dos moluscos lymnaeídeos, embora já tenha sido demonstrada uma associação genética com essa variação. No continente Americano, os problemas na classificação estão relacionados com o grupo *Galba/Fossaria* e com várias espécies muito semelhantes, por vezes indiferenciáveis como é o caso de *L. cubensis*, *G. truncatula* e *L. cousini* (Bargues *et al.*, 2011c). O recurso a técnicas moleculares veio complementar os dados existentes, trazendo novas informações, e inclusive, sugerindo alterações à classificação já existente (Jabbour-Zahab *et al.*, 1997). O facto de os Lymnaeidae estarem associados à epidemiologia e controlo da fasciolose, levou à necessidade de procurar novas técnicas que facilitassem a classificação de espécies, caracterização genética de populações naturais e de outras mantidas em laboratório e assim esclarecer a sistemática e taxonomia dos gastrópodes deste género. Assim, os marcadores moleculares de DNA nuclear ribossomal (*rDNA*) e DNA mitocondrial (*mtDNA*) são importantes para este tipo de estudos nos invertebrados (Bargues *et al.*, 2011c).

1.2. Amplificação e sequenciação de DNA

1.2.1. Amplificação e sequenciação do gene ribossomal 18S

As moléculas de *rRNA* são bons marcadores moleculares, pois, através da sua análise é possível observar os padrões de alteração das sequências nucleotídicas (Wheeler & Honeycutt, 1988). Estas moléculas apresentam diferentes taxas de evolução, sendo bastante usadas em estudos filogenéticos.

O gene *18S*, também denominado de pequena subunidade do RNA ribossomal (*rRNA*) (Figura 47), tem a particularidade de evoluir mais lentamente do que o *28S*

*r*RNA, sendo por isso mais frequentemente usado em filogenia. Segundo Bargues & Mas-Coma (1997) a sequência da sub-unidade *18S r*RNA é um excelente marcador para distinção entre espécies dentro do género *Lymnaea*.

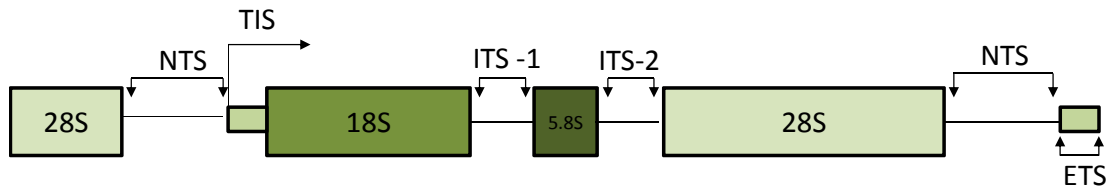


Figura 47. Esquema do gene *r*RNA (*r*DNA). *NTS*: espaçador não transcrito; *TIS*: local de iniciação da transcrição; *ITS*: espaçador interno transcrito; *ETS*: Espaçador externo transcrito (adaptado de Stothard *et al.*, 2000).

1.2.2. Amplificação e sequenciação da região *ITS-2* do *r*DNA

Os espaçadores internos transcritos (*ITS*) do *r*DNA, *ITS-1* e *ITS-2* (Figura 47), mas principalmente o *ITS-2*, têm-se mostrado bons marcadores no estudo das relações específicas, supra-específicas e populacionais entre os moluscos do género *Lymnaea* (Bargues and Mas-Coma, 2005, Bargues *et al.*, 2011c). Em trabalhos efectuados com várias populações Europeias e Americanas de *Lymnaea* verificou-se que algumas pertencentes a espécies diferentes apresentavam sequências nucleotídicas idênticas, enquanto outras da mesma espécie apresentaram sequências diferentes (Bargues & Mas-Coma, 2005). Trata-se de um marcador amplamente utilizado não apenas em taxonomia (Almeyda-Artigas *et al.*, 2000, Prasad *et al.*, 2011, Morgan-Ryan *et al.*, 2002, Chen *et al.*, 2000) mas também em filogenia de outras espécies de moluscos de água doce (Morgan *et al.*, 2002) assim como de plantas (Baldwin, 1992), de artrópodes (Wilkerson *et al.*, 2004), nemátodes (Spiridonov *et al.*, 2004), cestodes (Logan *et al.*, 2004), tremátodes (Bowles *et al.*, 1995), entre outros.

1.3. PCR-RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*

PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*), é uma técnica que explora variações em sequências homólogas de DNA. Na análise de RFLP, a amostra de DNA é quebrado em fragmentos (digerida) pelas enzimas de restrição e os fragmentos de restrição resultantes são separados, de acordo com os seus comprimentos, em electroforese. Dado que as enzimas de restrição (específicas) vão reconhecer zonas específicas da cadeia nucleotídica, em caso de alterações na própria cadeia, irá dar origem a fragmentos de diferentes tamanhos pertencentes à mesma região do genoma (Caldeira *et al.*, 1998).

Trata-se técnica robusta e rápida tendo-se mostrado uma “ferramenta” importante em estudos de identificação de várias espécies de moluscos dos géneros *Lymnaea* (Carvalho *et al.*, 2004), *Biomphalaria* (Vidigal *et al.*, 2000, Caldeira *et al.*, 2000, Carvalho *et al.*, 2001) e *Bulinus* (Rollinson *et al.*, 1998) assim como de outros organismos, nomeadamente helmintas (Utuk *et al.*, 2008, Caldeira *et al.*, 2003, Barber *et al.*, 2000), protozoários (Yi *et al.*, 2009) e artrópodes (Van Bortel *et al.*, 2002). Além dos bons resultados que permite obter, fornece perfis relativamente simples de analisar.

1.4. RAPD-PCR – “*Random Amplified Polymorphic DNA*”

A análise de polimorfismos – *Random amplified polymorphic DNA* (RAPD-PCR) veio permitir a análise de determinadas regiões polimórficas do DNA sem conhecer previamente o gene ou a sequência genómica, pelo que constitui uma mais valia na distinção entre as várias populações ou espécies (Spada *et al.*, 2002). É uma ferramenta importante para estudos de polimorfismos de DNA (Calienes *et al.*, 2004). Ao contrário da análise tradicional PCR, RAPD-PCR não requer qualquer conhecimento específico da sequência do DNA do organismo-alvo: as SeqIn idênticos vão ou não amplificar um segmento de DNA, de acordo com as posições que são complementares à sequência (Williams *et al.*, 1990, Wang *et al.*, 1993).

Trata-se de uma técnica muito eficiente e sensível para detectar marcadores genéticos, constituindo uma “ferramenta” muito atractiva para estudos de variabilidade genética em populações de diferentes grupos de organismos (Vargas *et al.*, 2003), incluindo gastrópodes de água doce (Calienes *et al.*, 2004).

Este tipo de análise tem sido usado em estudos de variabilidade genética entre populações de *L. columella* (Cardoso *et al.*, 2006), *B. glabrata* (Oliveira *et al.*, 2010) do Brasil e *Bulinus africanus* (Stothard *et al.*, 1997, Raahauge & Kristensen, 2000).

2. Objectivos

- Determinar a variabilidade genética dos moluscos *L. truncatula* colhidos nos quatro distritos de Portugal continental e na ilha da Madeira, pelas técnicas de sequenciação do gene *18S* do *rDNA* e PCR-RFLP da região *ITS-2* do *rDNA*;
- Estudar a variabilidade inter- e intra-populacional de *L. truncatula*, pela técnica de RAPD-PCR

3. Material e Métodos

Quando da escolha dos marcadores moleculares a estudar para caracterização molecular dos moluscos *L. truncatula*, pensou-se num marcador mais conservado, com menor taxa de evolução e outros marcadores relativos a regiões mais polimórficas do genoma, para poder detectar pequenas alterações no genoma dos moluscos. Assim seleccionou-se o gene *18S*, por ser um gene muito conservado. Por outro lado, a técnica de RAPD-PCR, que permite detectar pequenos polimorfismos ao longo de todo o genoma dos moluscos. Perante os resultados de RAPD recorreu-se a outro tipo de análise, RFLP, aplicada a uma região mais polimórfica do genoma, a região *ITS-2* do *rDNA*. Com base nos perfis de restrição obtidos foi efectuada a sequenciação da região *ITS-2* do *rDNA* e posterior análise filogenética.

3.1. Extracção de DNA

O DNA total foi extraído da região cefalopodal (formada pela cabeça e pelo pé do molusco) com CTAB (Cetyltrimethylammonium Bromide) (adaptada de (Stothard *et al.*, 1996)). Colocou-se o CTAB (Tris, NaCl, EDTA, CTAB, Mercaptoetanol) na estufa a 55°C, durante 10 minutos. Colocou-se o molusco num tubo de Eppendorf 1,5 ml e adicionaram-se 600 µl de tampão CTAB e 10 µl de proteinase K (20mg/ml) (Bioline). O tampão CTAB solubiliza as membranas, formando com um DNA, um complexo que vai facilitar, posteriormente, a sua precipitação. A proteinase K remove as nucleases e degrada as outras proteínas.

Os tecidos do molusco foram dissolvidos com um homogeneizador de plástico. Após a obtenção de uma solução homogénea, sem partículas (tecidos) visíveis, deixou-se na estufa a 55°C, durante uma hora e trinta minutos, fazendo agitações por inversão de quinze em quinze minutos. Após a incubação, juntaram-se 600 µl de clorofórmio isoamílico (24:1) (AppliChem), e agitou-se por inversão durante dois minutos. O clorofórmio isoamílico provoca a desnaturação das proteínas, tornando-as insolúveis na fase aquosa onde se encontra o DNA. Seguidamente fez-se uma centrifugação rápida e, retirou-se o sobrenadante que contém o DNA. Prepararam-se novos tubos Eppendorf de 1,5 ml aos quais se adicionaram 800 µl de etanol absoluto gelado e o sobrenadante

retirado do tubo original. Centrifugou-se a 14 800xG durante vinte minutos. Após centrifugação, decantou-se e adicionaram-se 500 µl de etanol a 70%. Centrifugou-se novamente à mesma velocidade de rotação durante 15 minutos e decantou-se. Com a ponta de uma pipeta de Pasteur de vidro, retiraram-se os restos de etanol e colocaram-se os tubos abertos na estufa, no máximo de 15 minutos, para evaporar algum etanol ainda presente. Por fim, adicionaram-se 50 µl de tampão TE (Tris-EDTA, pH 8,0) (AppliChem).

A visualização dos resultados da extracção de DNA foi feita por electroforese em gel de agarose a 1,5% (m/v) em tampão TAE (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1mM; pH 8,3) (AccuGENE®), após coloração com brometo de etídio na concentração de 0,5 µg/ml. O brometo de etídio é um agente que possui a capacidade de se intercalar nas cadeias de DNA, e que, quando exposto a luz ultravioleta, emite fluorescência. Esta fluorescência foi observada num documentador de imagem AlphaImager HP (Alpha Innotech). A proporção utilizada foi de 2µl de amostra e 2 µl de tampão de deposição, composto por azul de bromofenol e glicerol.

Juntamente com as amostras foi sempre colocado um marcador de massa molecular de 1000 pares de bases - “*Hyperladder IV*”, ou 2000 pares de bases - “*Hyperladder II*” (Bioline).

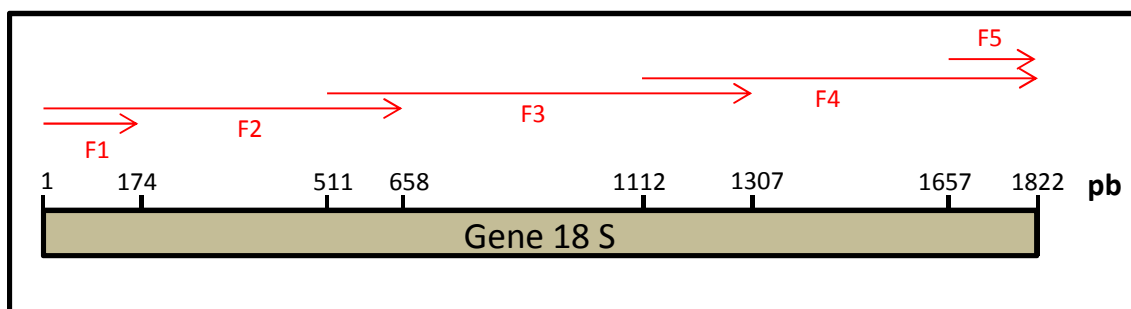
Foi efectuada extracção de DNA de cento e sete moluscos *L.truncatula*, pertencentes a vários habitats e colhidos em diferentes datas. Além das amostras de moluscos dos cinco distritos estudados (quatro do continente e um da ilha da Madeira) foram incluídos dois moluscos colhidos num habitat (Estoi) pertencente ao distrito de Faro, região do Algarve.

3.2. Amplificação de DNA

3.2.1. Amplificação do gene *18S* do *rDNA*

Foram testados cinco pares de sequências iniciadoras (SeqIn) para amplificação do gene *18S* do DNA ribossomal, de acordo com (Bargues & Mas-Coma, 1997) (Figura 48) (Tabela 42).

Foram ainda testadas diferentes concentrações de SeqIn e DNA para seleccionar a mais adequada.

Figura 48. Esquema do gene *18S*, evidenciando os fragmentos amplificados com os vários pares de SeqIn.

F1, F2, F3, F4 e F5: Fragmentos amplificados; pb: pares de bases

Uma vez que a área de sobreposição das sequências nucleotídicas dos fragmentos amplificados era grande, nomeadamente entre os fragmentos F2, F3 e F4, optou-se por não amplificar F1 e F5.

Tabela 42. SeqIn selecionadas para amplificação do gene *18S*

Fragmento a amplificar	Sequência iniciadora 3'-5'	Sequência iniciadora 5'-3'
F1	Lym1 – 5' AAC CTG GTT GAT CCT GCC A 3'	Lym174 - 5' GCA TGT ATT AGC TCT AG 3'
F2	Lym1 – 5' AAC CTG GTT GAT CCT GCC A 3'	Lym658 – 5' CTG AGA TCC AAC TAC GAG CTT 3'
F3	Lym511 – 5' GGC CCC GTA ATT GGA ATG AGT A 3'	Lym1307 – 5' CAC CAC CCA CCG AAT CAA GAA A 3'
F4	Lym1112 - 5' GCA GCT TCC GGG AAA CCA AAG T 3'	Lym1822 – 5' TGA TCC TTC CGC AGG TTC ACC T 3'
F5	Lym1657 – 5'CTG CCC TTT GTA CAC ACC G	Lym1822 – 5' TGA TCC TTC CGC AGG TTC ACC T 3'

A PCR foi efectuada recorrendo ao Kit - Illustra™ PuReTaq™ Ready-To- Go™ PCR Beads (GE-Healthcare) e efectuada num termociclador “Primus evolution 96 Gradient”.

Utilizaram-se para cada reacção, 0,5 µl de DNA (amostra), 10 pmol de cada SeqIn e 22,5 µl de água ultra pura (18,2 MΩ.cm). Foi sempre utilizado um controlo

negativo, processado com as amostras, com a diferença de que a amostra foi substituída por água.

O programa da PCR foi otimizado para cada fragmento a amplificar. Assim, para amplificação dos fragmentos F2 e F4 os ciclos da PCR foram os mesmos, ou seja: um ciclo de desnaturação a 94°C durante 60 seg, seguido de 30 ciclos de 94°C, 60 seg; 52°C, 90 seg e 72°C, 60 seg, e por fim um ciclo para extensão da cadeia, a 72°C durante 7 minutos.

Para o fragmento F3 efectuou-se um ciclo de desnaturação a 94°C, durante 60 seg, seguido de 30 ciclos de 94°C, 30 seg; 52°C, 30 seg e 72°C, 45 seg, e um ciclo final a 72°C durante 7 minutos.

3.2.2. Amplificação da região *ITS-2* do rDNA

A PCR foi efectuada recorrendo ao Kit - Illustra™ PuReTaq™ Ready-To-Go™ PCR Beads (GE-Healthcare) e efectuada num termociclador Primus evolution 96 Gradient.

Para amplificação da Região *ITS-2*, foram testados vários pares de SeqIn previamente descritos por outros autores, com os respectivos ciclos de PCR. No entanto, aqueles com os quais se obtiveram melhores resultados foram ITS2f (5' CGT CCG TCT GAG GGT CGG TTT GC 3') (Vidigal *et al.*, 2000) e ETTS1 (5' TGC TTA AGT TCA GCG GGT 3') (Kane & Rollinson, 1994). As condições da PCR foram semelhantes às descritas por (Vidigal *et al.*, 2000), com alteração apenas da temperatura de ligação. Foi feito um ciclo de desnaturação a 95°C durante 3 min, seguido de 32 ciclos de 95°C, 45 seg; 60°C, 60 seg e 72°C, 2 min, e um ciclo final a 72°C durante 5 minutos. Assim, procedeu-se à amplificação do DNA de 107 moluscos *L. truncatula*.

3.2.2.1. PCR-RFLP - aplicada à região *ITS-2* do rDNA

Após amplificação da região *ITS-2*, o produto amplificado foi sujeito a um processo de restrição enzimática com a enzima *HpaII* (Promega). A reacção foi efectuada de acordo com o protocolo do fabricante. Para um volume final de 20 µl, em que se adicionaram 16,3 µl de água ultra pura (18,2 MΩ.cm), 2 µl de Tampão RE 10x, 0,2 µl de BSA acetilada (10 µg/µl), 1µl DNA. Após agitação com a pipeta adicionou-se 0.5 µl de Enzima (10u/µl). Voltou-se a agitar levemente com a pipeta e centrifugou-se

alguns segundos numa microcentrifuga. As amostras foram incubadas durante 1 hora na estufa (Memmert) a uma temperatura de 37°C, para a digestão ocorrer.

Terminada a reacção, adicionou-se todo o produto num gel de agarose a 3%, com 10 µl de tampão de deposição e por fim observou-se a fluorescência emitida num documentador de imagem AlphaImager HP (Alpha Innotech).

3.3. Purificação e sequenciação do DNA amplificado

3.3.1. Purificação do DNA

Antes da sequenciação, as amostras foram todas purificadas, para retirar os excessos de SeqIn e dNTP's, assim como enzimas e outros restos de tampão provenientes do processo de amplificação, que possam afectar a sequenciação.

No processo de purificação usaram-se colunas de purificação QIAquick PCR™ da QIAGEN, com uma pequena alteração em relação ao protocolo do fabricante (Anexo 2). Esta alteração refere-se a que na eluição final, se utilizou 30 µl de tampão de eluição, para podermos obter um produto mais concentrado.

3.3.2. Sequenciação

As reacções de sequenciação foram efectuadas num sequenciador automático comercial, na empresa STABvida. As SeqIn usadas para a sequenciação, foram as mesmas que se utilizaram na PCR inicial. As amostras foram sequenciadas nos dois sentidos (3'/5' e 5'/3') e as sequências editadas no programa “*BioEdit Sequence Alignment Editor*” versão 7.1.3.0. (Hall, 1999) (Anexos 3 e 4).

Para amplificação do gene *18S*, seleccionaram-se 34 amostras dos vários habitats estudados, colhidos em diferentes datas.

Relativamente ao *ITS-2*, com base nos diferentes perfis de restrição obtidos, decidiu-se sequenciar 2 amostras de cada perfil obtido.

3.3.3. Análise filogenética

As sequências nucleotídicas obtidas pela sequenciação foram analisadas através do programa *Basic Local Alignment Search Tool* - (*Blast*) (disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), o que permitiu a pesquisa de sequências semelhantes depositadas na base de dados *NCBI (National Center for Biotechnology Information)* “*GenBank*”, para a análise filogenética.

Os estudos de inferência filogenética foram realizados recorrendo a dois critérios diferentes: “máxima verosimilhança” e “análise Bayesiana”.

Para a análise pela máxima verosimilhança as sequências nucleotídicas obtidas para os marcadores genéticos (gene *18S* e *ITS-2* do *rDNA*) foram alinhadas com o apoio do programa “*BioEdit*” versão 7.1.3.0 (Hall, 1999). A análise foi efectuada com o auxílio do programa “*Mega*” 5.05 (Tamura *et al.*, 2011), o qual seleccionou o modelo mais apropriado para elaboração das árvores (Anexos 7 e 8).

Para análise bayesiana as sequências nucleotídicas foram alinhadas no programa “*MAFFT*”, versão 6 (Katoh *et al.*, 2002).

As relações filogenéticas foram inferidas, usando os modelos evolutivos sugeridos por *J modeltest* (Posada, 2008), segundo o critério informativo de Akaike, com o programa informático “*MrBayes*” v3.0b4 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003).

Na abordagem de pesquisa de árvore com base no critério de máxima verosimilhança o programa procura a árvore que maximiza a probabilidade de observar as sequências com as quais estamos a trabalhar [ou seja, é calculada a probabilidade dos dados de uma dada uma árvore e um modelo evolutivo, ou seja $P(\text{dados}, \text{árvore}, \text{modelo})$].

A análise Bayesiana procura encontrar a árvore que maximiza a probabilidade da mesma tendo em conta os dados e um modelo evolutivo, ou seja $P(\text{árvore}, \text{dados}, \text{modelo})$.

Do ponto de vista prático, enquanto a máxima verosimilhança dá como resultado uma árvore (cuja consistência topológica pode ser investigada, adicionalmente, com *bootstrapping*) a análise bayesiana trabalha com uma distribuição de árvores com probabilidade aproximada, e a probabilidade associada aos diferentes ramos (chamada probabilidade *a posteriori*) é igual à frequência dos diferentes agrupamentos nesse conjunto (distribuição) de árvores que são analisadas.

Para cada marcador genético estudado (gene *18S* e região *ITS-2* do *rDNA*) foram calculados os vários haplotipos para as sequências estudadas, assim como as diversidades haplotípica (H_d) e nucleotídica (π), recorrendo ao programa informático “*DnaSP*” versão 5.10.01 (Librado & Rozas, 2009). A diversidade haplotípica permite saber a probabilidade de, ao retirar aleatoriamente dois haplotipos de uma amostra, estes serem diferentes, enquanto a diversidade nucleotídica indica o número médio de diferenças (por site) entre duas sequências retiradas ao acaso de uma amostra. O nível de confiança dos resultados foi avaliado pelo valor de *bootstrap*. O *bootstrap* não é mais do que um teste estatístico que mede o grau de suporte dos nós das árvores filogenéticas, de acordo com o alinhamento das sequências nucleotídicas. O valor obtido representa o número de vezes que o agrupamento ocorreu nas replicações. Esse valor deve ser superior a 95%.

3.3.3.a. Análise do gene *18S*

A construção da árvore filogenética do gene *18S* foi efectuada tendo como base as sequências nucleotídicas de 34 moluscos (31 do continente e 3 da ilha da Madeira), e com 15 sequências obtidas do “*GenBank*”, referentes a moluscos que apresentavam maior homologia (após análise *BLAST*) com as sequências obtidas por nós.

A análise filogenética pelo método da máxima verosimilhança foi baseada no modelo de Jukes-Cantor (Jukes and Cantor, 1969). A árvore foi elaborada com base no logaritmo de verosimilhança mais elevado (0.0000). Foram eliminados todos os *gaps* eventualmente presentes nas sequências.

Foi utilizada uma distribuição Gamma (discreta) na modelação da heterogeneidade nas taxas de substituição nucleotídica ao longo das sequências analisadas (5 categorias (+G, parâmetro = 0.2097)).

A árvore Bayesiana foi construída tendo como base o modelo de Tamura-Nei (TrN+G) (Tamura & Nei, 1993). A análise efectuada baseou-se em amostragens a cada 20×10^6 gerações iniciadas a partir de um árvore aleatória e quatro cadeias de Markov, e das quais foram excluídas (como *burn-in*) os primeiros 10% das mesmas. Na árvore que reflecte a análise de sequências *18S* foi utilizada a sequência U65225 como *outgroup*. Foi igualmente utilizada uma distribuição Gamma (discreta) na modelação da

heterogeneidade nas taxas de substituição nucleotídica ao longo das sequências analisadas.

3.3.3.b. Análise da região *ITS-2*

A árvore filogenética referente à região *ITS-2* foi construída com sequências nucleotídicas de 8 moluscos (6 do continente e 2 da ilha da Madeira), e com 23 sequências obtidas do “*GenBank*”, referentes a moluscos que apresentavam maior homologia (após análise BLAST) com as sequências obtidas por nós.

A análise filogenética da região *ITS-2* foi efectuada usando o método da máxima verosimilhança baseada no modelo de Kimura 2-parametros (Kimura, 1980). A árvore apresentada foi a que evidenciou um logaritmo de verosimilhança mais elevado (-818.3599). Foram eliminados todos os *gaps* eventualmente presentes nas sequências.

A árvore Bayesiana foi construída tendo como base o modelo transversional (TVM+G) (Posada, 2002). A análise efectuada baseou-se em amostragens a cada 20×10^6 gerações iniciadas a partir de um árvore aleatória e quatro cadeias de Markov, e das quais foram excluídas (como *burn-in*) os primeiros 10% das mesmas. Na árvore que reflecte a análise de sequências *ITS*, a raiz foi introduzida no ponto médio da mesma (*midpoint*). Foi utilizada uma distribuição Gamma (discreta) na modelação da heterogeneidade nas taxas de substituição nucleotídica ao longo das sequências analisadas.

3.4. RAPD-PCR

A análise RAPD-PCR foi realizada recorrendo a 9 SeqIn, descritas Por (Stothard *et al.*, 2000) (Tabela 43), com o objectivo de estudar a variabilidade genética intra-populacional.

As amostras foram amplificadas com o Kit da PCR GoTaq®FlexiDNA Polymerase (Promega) .

Tabela 43. SeqIn usadas para análise RAPD-PCR

Nome	Sequência da SeqIn
OPA02	5' TGC CGA GCT G 3'
OPA10	5' GTG ATC GCA G 3'
OPA11	5' CAA TCG CCG T 3'
OPF11	5' TTG GTA CCC C 3'
JRSS1	5' AGC CAG CGA A 3'
12SAH	5' GAG GGT GAC GGG CGG TGT GT 3'
ATP1	5' AGG GCT CTA TCC GCT AGG CA 3'
RJS4	5' TCG GTT CAA CTA AAG 3'
OPY12	5' AAG CCT GCG A 3'

Num volume total de 50 µl, adicionaram-se 2,5U de *Taq* polimerase, 3mM de MgCl₂, 50 pmol SeqIn, 3 mM dNTP, 2,5 mM (5 µl) de tampão, e o restante volume de água ultra pura (18,2 MΩ.cm).

As condições da PCR foram adaptadas de (Stothard & Rollinson, 1996), com um ciclo de desnaturação a 94°C durante 5 min, seguido de 38 ciclos a 94°C, 15 seg; 40°C, 30 seg e 72°C, 90 seg com um ciclo final a 72°C durante 10 minutos.

4. Resultados

4.1. Estudo do gene ribossomal *18S*

4.1.1. Amplificação e sequenciação

Foi amplificado e sequenciado o gene *18S* de 47 moluscos, colhidos de 18 habitats (Anexo 3). Obtiveram-se 5 fragmentos com diferentes tamanhos (tabela 44), de acordo com as diferentes SeqIn utilizadas (Figura 49).

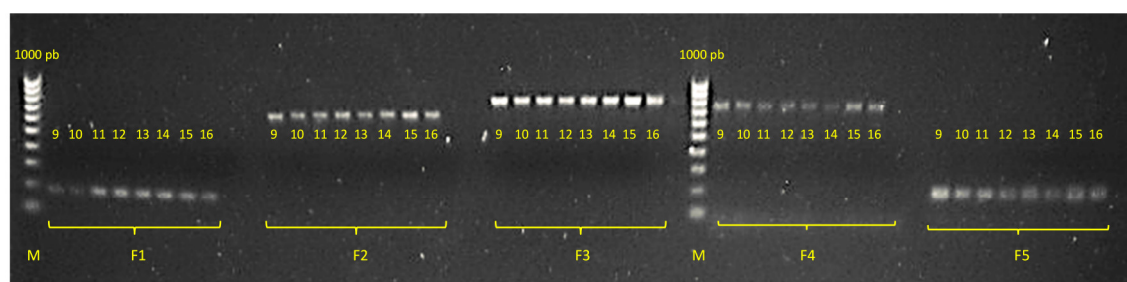


Figura 49. Resultado obtido após amplificação do gene *18S* do *rDNA* com 5 pares diferentes de SeqIn.

Tabela 44. Pesos moleculares dos fragmentos amplificados do gene *18S*

Fragmento amplificado	Peso molecular (pb – pares de bases)
F1	≅150/200
F2	≅600/700
F3	≅800
F4	≅700
F5	≅150/200

Várias sequências não apresentaram boa qualidade, apresentando muito ruído, pelo que foram retiradas do estudo, passando a efectuar-se com sequências obtidas de 34 moluscos. Estas amostras foram separadas em 4 grupos, cada um deles com um perfil nucleotídico específico (P1, P2, P3 e P4) (Tabela 45). As variações nucleotídicas (Tabela 46), com percentagens de Timinas (T), Citosinas (C), Adeninas (A) e Guaninas (G) foram muito semelhantes entre os vários perfis nucleotídicos encontrados (Tabela 45).

Tabela 45. Composição nucleotídica das sequências do gene *18S* do rDNA

Perfil nucleotídico	Haplótipo	% T	% C	% A	% G	Total nucleotídeos
P1	H1	24,8	23,7	23,6	27,9	1773
P2	H1	24,7	23,7	23,6	27,9	1772
P3	H2	24,9	23,7	23,6	27,8	1781
P4	H3	24,8	23,8	23,7	27,8	1780

T: timina; C: citosina; A: adenina; G: guanina

Tabela 46. Diferenças nucleotídicas na sequência do gene *18S* do rDNA, referentes aos vários perfis nucleotídicos observados.

Perfil nucleotídico	Sequência nucleotídica				
	210	220	230	237	1781
P1	. . . T . . T . . . - - - - - . . . A . . G . . . T T				
P2	. . . T . . T . . . - - - - - . . . A . . G . . . T -				
P3	. . . G . . A . . . A T T C A C T T . . . T . . T . . . T T				
P4	. . . G . . A . . . A T T C A C T T . . . T . . T . . . C -				

T: timina; C: citosina; A: adenina; G: guanina

De acordo com a análise efectuada com o programa DNAsp, foram detectados 3 haplotipos (Tabela 45). Os valores obtidos para as diversidades haplotípica (H_d) e nucleotídica (π), no total dos distritos estudados foram baixos: $H_d = 0,383$ e de $\pi = 0,00087$. Com base nestes valores, e apesar de se terem observado 4 perfis nucleotídicos, o programa apenas se considerou 3 haplotipos, incluindo as amostras com o perfil P2 no haplótipo H1, que inclui igualmente, as amostras com perfil P1.

Observou-se apenas 1 haplótipo por habitat, com a excepção de Soure, onde foram encontrados 2 haplotipos: H1 e H2 (Tabela 47).

Tabela 47. Perfis nucleotídicos encontrados e respectivos haplotipos, por habitat estudado

Habitat	Distrito	Nº de amostras	Perfil nucleotídico	Haplotipo
Soure	Coimbra	1	P1	H1
Vale Mondego II		2		
Vale Mondego V		1		
Choupal		2		
Souselas		2		
Veados	Lisboa (Tapada Nacional de Mafra)	2		
Veados B		2		
MV		1		
Mourão	Évora	2		
Penedos	Leiria	2		
Vila Verde		2		
Gafaria		2		
Alcaidaria		1		
Grácios		2		
Boaventura	Funchal (Ilha da Madeira)	1	P2	H1
Ponta de S. Lourenço		1		
Soure	Coimbra	5	P3	H2
Estoi	Faro	2		
Quinta Grande	Funchal (ilha da Madeira)	1	P4	H3

P1,P2,P3,P4: perfis nucleotídicos; H1,H2,H3: haplotipos

4.1.2. Análise filogenética

A análise filogenética revelou que as amostras estudadas se distribuem por 2 grupos distintos. Um grupo, onde se insere a maioria das amostras obtidas neste trabalho, é formado por vários isolados com sequências homólogas pertencentes à espécie *Lymnaea (Galba) truncatula* (Figuras 5 e 6). As restantes amostras inserem-se num segundo ramo, no qual se encontram outros moluscos lymnaeídeos identificados como *Lymnaea* sp e outros como *Lymnaea schirazensis*, provenientes de Espanha e Colômbia. Neste segundo agrupamento estão localizadas 5 amostras de Soure, as amostras de Estoi e ainda uma amostra da ilha da Madeira. Esta separação está bem patente quer pela análise por máxima verosimilhança (Figura 50) quer por análise Bayesiana (Figura 51). Apesar dos valores de *bootstrap* obtidos no primeiro caso não serem superiores a 80%, as topologias das árvores filogenéticas obtidas foram consistentes, independentemente do tipo de abordagem escolhido para análise, confirmando a consistência dos resultados.



Figura 50. Análise filogenética do gene *18S* do *rDNA*, pelo método da máxima verosimilhança. (n): número de amostras

Na árvore produzida pela análise Bayesiana a divisão em dois ramos distintos é suportada por um elevado valor de *bootstrap* (0.99), sendo possível ainda observar uma separação entre as amostras estudadas da ilha da Madeira e as restantes de Portugal Continental desse grupo (Estoi e Soure), também com um valor de *bootstrap* próximo de 100% (Figura 51).

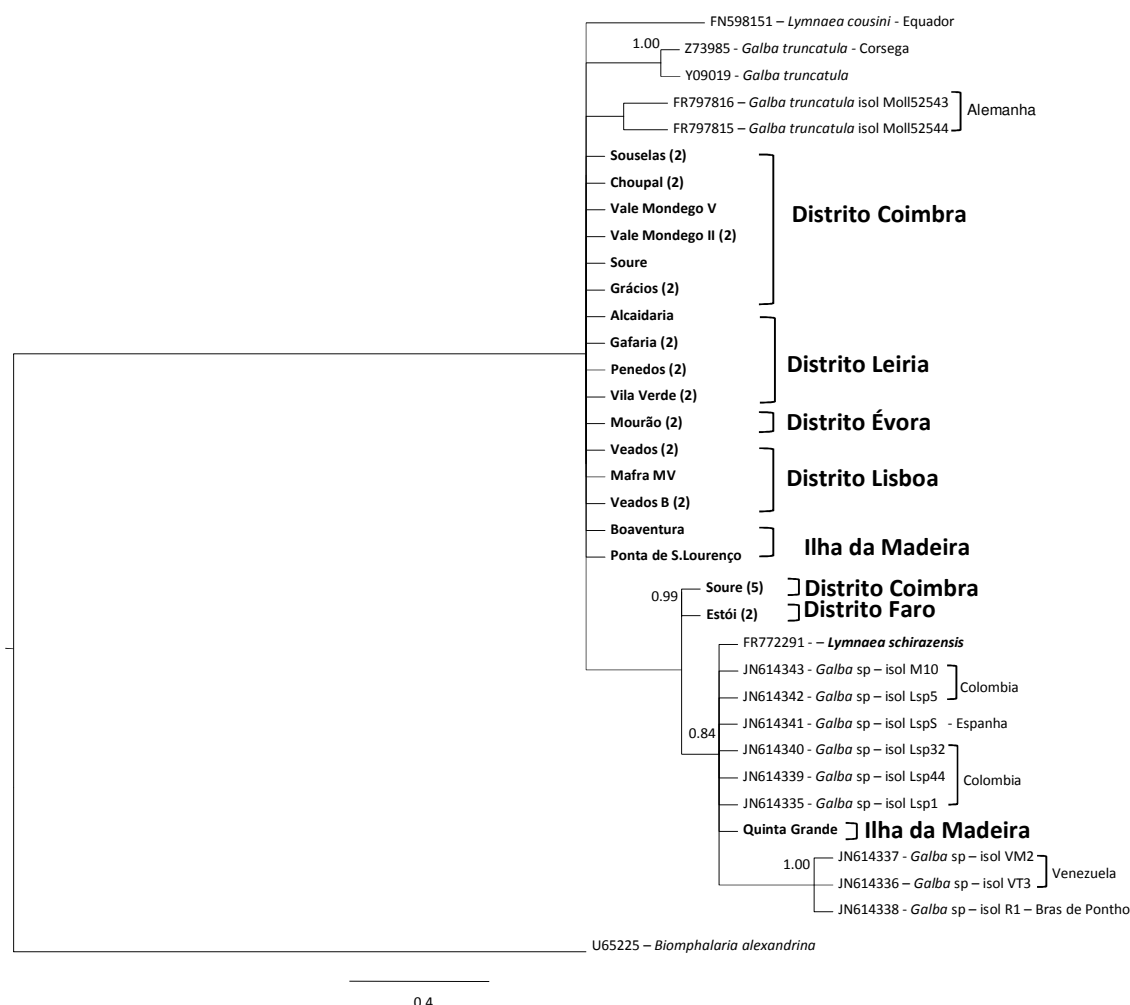


Figura 51. Análise filogenética do gene *18S* do *rDNA*, por análise Bayesiana. (n): número de amostras. Os traços na árvore antes dos nomes das amostras, representam diferentes amostras e não correspondem a distância genética.

4.2. Estudo da região *ITS-2* do *rDNA*

4.2.1. Amplificação de DNA

Ao todo, a região *ITS-2* do *rDNA* foi amplificada em 107 amostras. Obtiveram-se fragmentos de amplificação com cerca de 400 pares de bases (Figura 52), havendo variação de tamanhos entre as amostras (Figura 52), com dois tamanhos alternativos (indicados a amarelo e a vermelho).

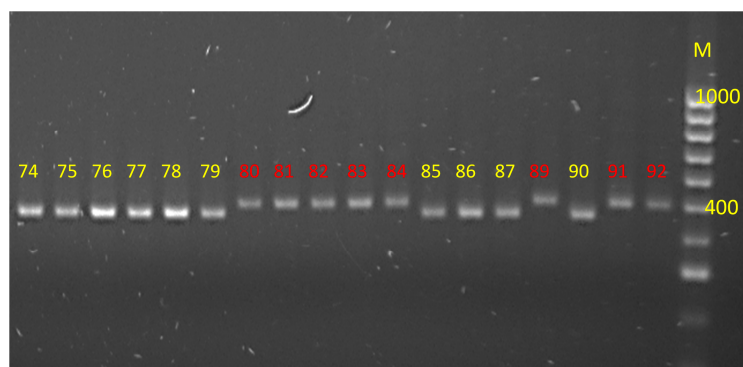


Figura 52. Produtos da amplificação da região *ITS-2* do *rDNA*. M: marcador de peso molecular

4.2.2. PCR-RFLP

Após amplificação da região *ITS-2* e digestão com enzima *HpaII*, as amostras estudadas evidenciaram 2 perfis de restrição, os quais foram denominados de “A” e “B” (Figura 53).

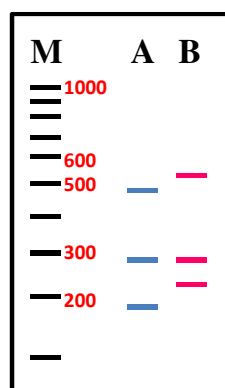


Figura 53. Perfil de restrição obtido após amplificação da região *ITS-2* e digestão com enzima *HpaII*. M: marcador de peso molecular; A - Perfil A; B – Perfil B

Das 107 amostras estudadas, apenas uma amostra (0,9%) apresentou resultados inconclusivos, como tal não foi incluída na Tabela 51. O perfil de restrição “A” foi observado na maioria dos moluscos. Em todos os habitats onde se encontraram moluscos exibindo o perfil de restrição “B”, também se encontraram amostras com o perfil “A”, exceptuando o habitat de Estoi (Tabela 48), ou seja, em todos os habitats que se encontraram moluscos *L. schirazensis*, existia *L. truncatula*, excepto em Estoi.

Tabela 48. Perfis de restrição obtidos e respectivos habitats de proveniência dos moluscos.

Perfil de restrição					
A					
Habitat	N	Distrito	Habitat	N	Distrito
Souselas I	4	Coimbra	Mafra MV	4	Lisboa (Tapada Nacional de Mafra)
Vale Mondego I	2		Veados	3	
Vale Mondego II	4		Veados B	2	
Soure	2		Campo da Barca	4	Funchal (ilha da Madeira)
VM5	5		Ponta de Pargo	5	
Vala Choupal	2		Camacha	5	
Souselas II	2		Garachico	3	
Gafaria	5	Leiria	S. Roque - Fundoa	1	
Vila Verde	2		Boaventura	5	
Alcaidaria	5		Tunel S. Vicente	5	
Penedos	2		Ponta S. Lourenço	5	
Grácios	2	Évora	Quinta Grande	2	
Mourão	4				
Valverde	3				
B					
Soure	7	Coimbra	Campo da Barca	1	Funchal (ilha da Madeira)
Vale Mondego II	1	Faro	Quinta Grande	3	
Estoi	2		S. Roque Fundoa	2	
			Garachico	2	

N: número de amostras

4.2.3. Sequenciação

Ao todo foram sequenciadas 8 amostras (Anexo 4), de acordo com os 2 perfis de restrição com o *HpaII*.

Tendo em conta a composição nucleotídica, as amostras estudadas foram separadas em 3 grupos, cada um deles com um perfil nucleotídico específico (Tabela 49).

Tabela 49. Composição nucleotídica das sequências da região *ITS-2* do *rDNA*

Perfil nucleotídico	Haplotipo	% T	% C	% A	% G	Total nucleotídeos
P1	H1	28,3	27,6	16,3	27,8	410
P2	H2	25,3	31,1	14,9	28,8	396
P3	H3	27,7	27,7	17,0	27,7	405

T: timina; C: citosina; A: adenina; G: guanina

As variações nucleotídicas na sequência da região *ITS-2* do *rDNA* foram em maior número do que para o gene *18S* do *rDNA* (Tabela 50), a avaliar também pelas

percentagens de Timinas (T), Citosinas (C), Adeninas (A) e Guaninas (G), com diferenças maiores entre os vários perfis nucleotídicos (Tabela 49).

A análise das sequências revelou a presença 3 haplotipos (Tabela 5). Os valores de Hd e de π foram mais elevados do que os observados na análise do gene *18S*. Assim, obtivemos valores de Hd de 0,714 e de π de 0,066. À semelhança do verificado para o gene *18S*, em todos os habitats estudados observou-se apenas 1 haplotipo, à excepção de Soure, onde foram encontrados 2 haplotipos: H1 e H2 (Tabela 51).

Tabela 50. Diferenças nucleotídicas na sequência da região *ITS-2* do *rDNA*, referentes aos vários perfis nucleotídicos observados.

Perfil nucleotídico	Sequência nucleotídica									
	18	34	40	50	59	100	105	111		
P1	..C	..T	..GGCGTGAGC	..CACGCTGCTC	..TG	..T
P2	..ACTT	..CTG	..TT	..
P3	..ACTT	..CCA	..CT	..
(Cont.)→	120	130	134	144	150	196	271	276	286	
P1CC	..C	..T	..TATTTATTATC		
P2	TGCTTGCTTGCTTGCTTGCT	..TA	..T	..A
P3	TGCTTGCTTGCTTGCTTGCT	..TA	..T	..A
(Cont.)→	289	316	321	347	355	363	370	375	381	
P1	CTG	..A	..C	..AT	..AC	..G
P2G	..T	..G	..GGCTTTAATAAGTCATT	..G	..G	..ATC	..T	..T
P3G	..T	..G	..GGCTTTAATAAGTCATT	..G	..G	..ATC	..T	..T
(Cont.)→	391	408	411	416	421	427	437	446		
P1	..C	..T	..G	..TCT	..CTCC	..G	..CC	..CAG
P2	..T	..TG	..A	..T	..ATA	..AGT	..T	..TA	..TA	..TT
P3	..T	..TG	..A	..T	..ATA	..TAACTAA	..TA	..TG	..TT	..A

T: timina; C: citosina; A: adenina; G: guanina; (.) nucleótidos comuns às 3 sequências; (-) gaps na sequência.

Tabela 51. Perfis nucleotídicos referentes à região *ITS-2* do *rDNA* e respectivos haplotipos por habitat.

Habitat	Distrito	Nº de amostras	Perfil nucleotídico	Haplotipo
Soure	Coimbra	2	P1	H1
Souselas		2		
Soure	Coimbra	2	P2	H2
Quinta Grande	Funchal (ilha da Madeira)	2	P3	H3

P1,P2,P3,P4: perfis nucleotídicos; H1,H2,H3: haplotipos

4.2.4. Análise filogenética

Os resultados obtidos na análise filogenética, tendo como base a região *ITS-2* do *rDNA*, foram semelhantes aos obtidos com o gene *18S*. Observa-se uma clara separação entre 2 grupos filogenéticos (Figuras 54 e 55): num dos ramos da árvore onde se incluem amostras de Soure (distrito de Coimbra) e Quinta Grande (Distrito do Funchal – Ilha da Madeira) são também incluídas amostras identificadas como *L. schirazensis* e outras sem identificação da espécie, referidas como *Lymnaea (Galba)* sp e *Galba* sp. Noutro ramo da árvore estão incluídas outras amostras de Soure e Souselas, assim como várias outras sequências homólogas, provenientes do “*GenBank*”, e identificadas como *Lymnaea (Galba) truncatula*. Estes resultados são suportados por valores de *bootstrap* próximos dos 100%. Pode também observar-se que dentro do primeiro ramo, as populações da ilha da Madeira destacam-se das de Soure, formando ainda outro ramo. Este resultado é bastante consistente dado o seu valor de *bootstrap*, 73% (ML) (Figura 54) e 99% por análise Bayesiana (Figura 55).

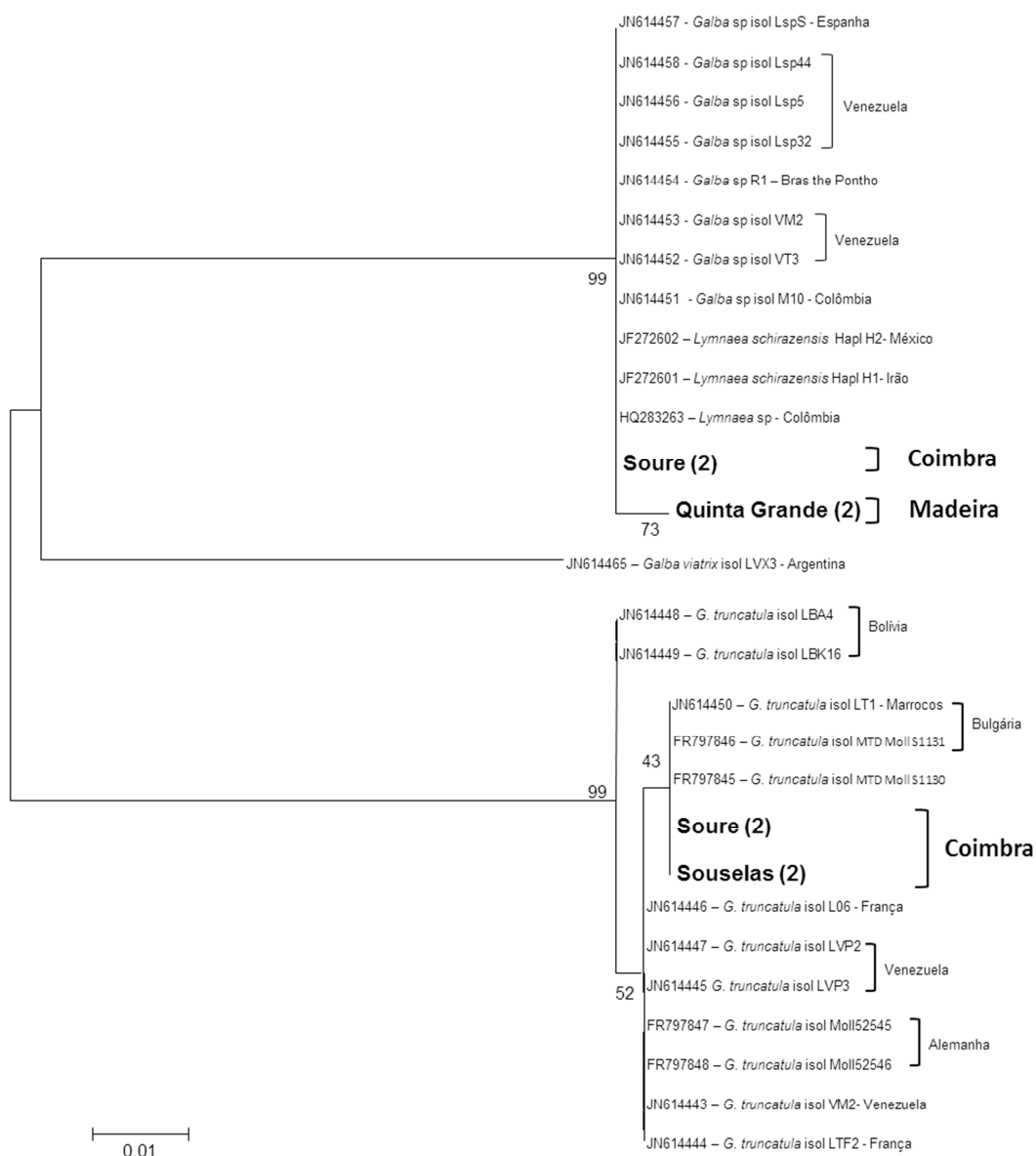


Figura 54. Análise filogenética da região *ITS-2* do *rDNA*, pelo método da máxima verosimilhança. (n): número de amostras

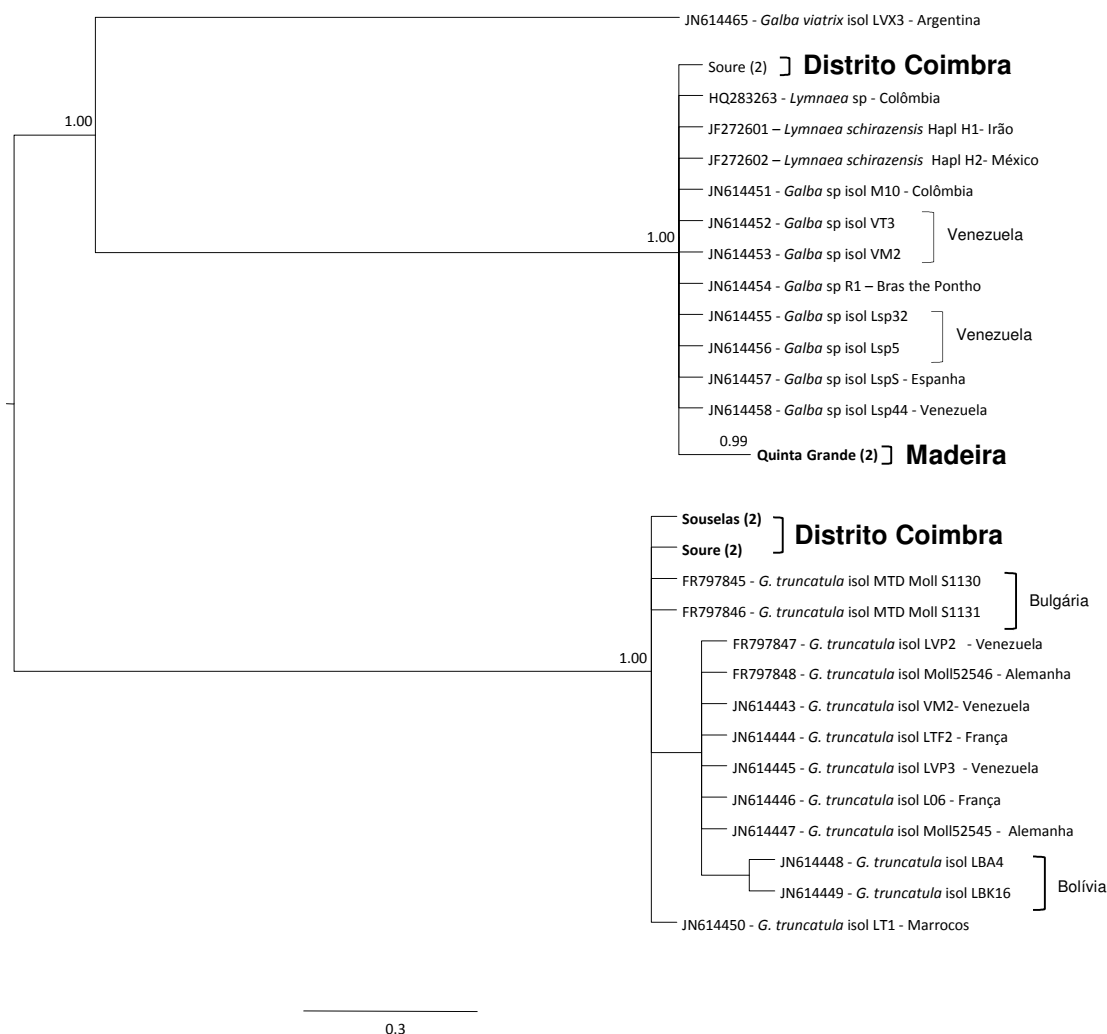


Figura 55. Análise filogenética da região *ITS-2* do *rDNA*, por análise Bayesiana. (n): número de amostras

4. 3. RAPD-PCR

De entre as várias SeqIn de RAPD-PCR testadas (Stothard *et al.*, 2000), apenas se obtiveram resultados passíveis de serem interpretados com um deles (OPA2). Por esta razão, este marcador foi o único usado como marcador para diferenciação de entre as amostras estudadas.

Entre as amostras incluídas no estudo, obtiveram-se dois perfis electroforéticos de RAPD-PCR distintos, denominados Perfil “A” e Perfil “B” (Figura 56).

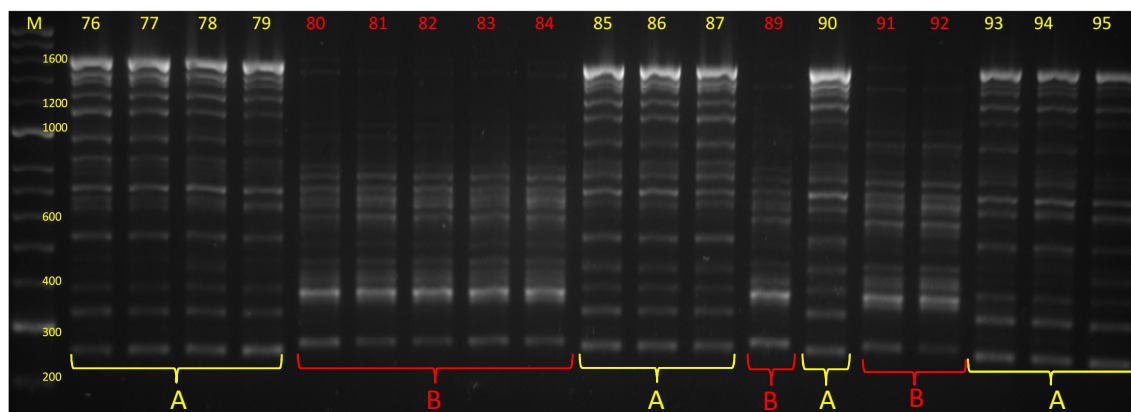


Figura 56. Perfil de RAPD-PCR obtido com o marcador OPA2. M: marcador de peso molecular; A: Perfil electroforético“A”; B: Perfil electroforético“B”.

Das 107 amostras estudadas, 5 (4,7%) apresentaram resultados inconclusivos, como tal não foram incluídas na tabela 8. O perfil de RAPD-PCR mais prevalente foi o perfil “A”, presente na maioria dos habitats. Em todos os habitats onde se encontraram moluscos exibindo o perfil de RAPD-PCR “B”, também se encontraram amostras com o perfil “A”, exceptuando o habitat de Estoi (Tabela 52).

Tabela 52. Perfis de RAPD - PCR obtidos e respectivos habitats de proveniência dos moluscos.

Perfil de RAPD-PCR					
A					
Habitat	Nº	Distrito	Habitat	Nº	Distrito
Souselas I	5	Coimbra	Mafra MV	4	Lisboa (Tapada Nacional de Mafra)
Vale Mondego I	2		Veados	3	
Vale Mondego II	4		Veados B	2	
Soure	2		Campo da Barca	4	Funchal (ilha da Madeira)
VM5	1		Ponta de Pargo	2	
Vala Choupal	2		Camacha	5	
Souselas II	2		Garachico	3	
Gafaria	5	S. Roque - Fundoa	1		
Vila Verde	2	Boaventura	5		
Alcaldaria	5	Tunel S. Vicente	5		
Penedos	2	Ponta S. Lourenço	5		
Grácios	2	Évora	Quinta Grande	2	
Mourão	4				
Valverde	5				
B					
Soure	7	Mondego	Campo da Barca	1	Funchal (ilha da Madeira)
Vale Mondego II	1		Quinta Grande	3	
Estoi	2	Faro	S. Roque Fundoa	2	
			Garachico	2	

N: número de amostras

5. Discussão

A identificação dos moluscos lymnaeidicos é um dos maiores desafios no estudo da diversidade malacológica, para o estabelecimento de mapas de risco epidemiológico (Remigio & Blair, 1997, Correa *et al.*, 2010). Apesar do seu interesse, o conhecimento da genética destes gastrópodes, assim como da sua relação com o parasita *F. hepatica* está muito longe de ser suficiente. A confusão ao nível da taxonomia/sistemática relativamente aos indivíduos desta família é grande (Correa *et al.*, 2011), nomeadamente os relacionados com espécies dos grupos “*Stagnicoline*”, na Europa e América do Norte; “*Radix*”, na Europa e Ásia; *Galba/Fossaria* nas Américas (*Galba* sinónimo de *Fossaria*) (Bargues *et al.*, 2011c). Estes problemas surgem, por um lado, devido à uniformidade interespecífica na classificação morfológica, e por outro lado, à variação intra-específica, dos caracteres da concha, dependente das condições ambientais. No entanto, esta variação não se deve unicamente ao ambiente, pois o fundo genético desempenha um papel importante neste capítulo. Os aspectos morfológicos da concha e a anatomia dos órgãos dos moluscos não são suficientes para a classificação da espécie e caracterização de populações. Este facto por si só justifica a grande confusão em torno dos géneros propostos para *truncatula* e para as espécies mais próximas nas américas: *cubensis* (América Central) *humilis* e *bulimoides*, *viatrix* e *diaphana* (América do Sul). Aparte do género *Galba* Schrank 1803, surgiram uma série de géneros nos quais se incluíam as espécies de *Galba/Fossaria* do Novo Mundo (*cubensis* e *viatrix*). Entre os vários géneros surgiram:

1. *Fossaria* Westerlund 1885 (*truncatula*);
2. *Nasonia* Baker 1928 (*cubensis*) - subgénero *Fossaria* (*Bakeri lymnaea*) Weyrauch, 1964 (*cubensis*); subgénero *Lymnaea* (*Afrogalba*) Kruglovet Starobogatov, 1985

Hubendick, em 1951, fez uma revisão dos moluscos lymnaeidicos, agrupando-os da seguinte forma:

1. *Lymnaea* (*Radix*) Monfort, 1810: *L. auricularia*, *L. peregra*
2. *Lymnaea* (*Galba*) Scranch, 1803: *L. truncatula*
3. *Lymnaea* (*Leptolymnaea*) Swainson 1840: *L. glabra*
4. *Lymnaea* (*Lymnaea*) Lamarck, 1799 *sensu stricto*: *L. palustris* e *L. stagnalis*

O interesse no estudo dos moluscos lymnaeidicos, além do malacológico, está no facto de transmitirem várias espécies de tremátodes com elevado impacte médico e veterinário. As espécies da família Lymnaeidae actuam como hospedeiros intermediários de cerca de 71 espécies de tremátodes, pertencentes a 13 famílias cujos hospedeiros definitivos são aves e mamíferos domésticos e silváticos (Bargues *et al.*, 2001).

Os estudos de transmissão de *F. hepatica* são complicados devido à grande quantidade de espécies de moluscos semelhantes morfologicamente que podem actuar como hospedeiros intermediários (Bargues *et al.*, 2007). Por exemplo, foram consideradas duas espécies *L. viatrix* e *L. cubensis*, como estando envolvidas na transmissão da fasciolose humana em zonas hiperendémicas do Altiplano da Bolívia, mas posteriormente provou-se que apenas se tratava de variantes de *L. truncatula*, importadas da Europa (Bargues *et al.*, 2011a, Bargues *et al.*, 2007, Mas-Coma *et al.*, 2001, Jabbour-Zahab *et al.*, 1997).

Um dos principais mecanismos usados pelos programas de controlo das parasitoses em que os agentes causais têm hospedeiros intermediários, é a monitorização das populações desses hospedeiros. No entanto, a eficácia de tais programas depende da correcta identificação das espécies envolvidas na transmissão parasitária. Isto porque nem todas as espécies apresentam a mesma sensibilidade à infecção por *F. hepatica*. As espécies *P. columella*, *G. truncatula* e *F. bulimoides* são susceptíveis à infecção por *F. hepatica*, mas *L. fuscus*, que é parcialmente resistente e *Stagnicola elodes* é totalmente refractária (McKown & Ridley, 1995, Vignoles *et al.*, 2002).

Por estas razões, houve uma grande necessidade de desenvolver novas ferramentas, nomeadamente as moleculares, para facilitar a classificação das espécies, a

caracterização genética das populações naturais, as estirpes laboratoriais e para elucidar sobre a sistemática e taxonomia dos Lymnaeidae (Bargues *et al.*, 2011a, Correa *et al.*, 2011, Hubendick, 1951, Bargues *et al.*, 2001).

Vários estudos revelaram que diferentes populações de moluscos lymnaeídeos, originalmente classificadas como pertencentes a diferentes espécies, tinham sequências nucleotídicas idênticas, mas que outras populações, originalmente classificadas como pertencentes à mesma espécie, apresentavam sequências diferentes. Por vezes as diferenças nas sequências são muito pequenas, sugerindo que existe variabilidade intra-específica (diferentes haplotipos). No entanto, alguns autores têm considerado que algumas destas diferenças detectadas em populações pertencentes à mesma espécie são suficientes para considerar uma espécie diferente (Bargues *et al.*, 2011a).

A análise filogenética das sequências nucleotídicas dos moluscos estudados, no que respeita ao gene *18S* e à região *ITS-2* do *rDNA*, revelou uma clara separação das amostras em dois grupos distintos. Um formado por amostras do estudo e por isolados de *L. truncatula* com sequências homólogas, retiradas do “*GenBank*”. O outro grupo era formado pelas restantes sequências em estudo e por isolados de uma outra espécie de *Lymnaea*, *L. schirazensis*, assim como outros isolados de moluscos identificados como *Lymnaea* sp, com sequências homólogas, retiradas do “*GenBank*”. O primeiro agrupamento já era esperado, uma vez que todos os moluscos tinham sido inicialmente identificados como *L. truncatula*, através dos caracteres morfológicos da concha. No entanto a presença de outra espécie com características morfológicas semelhantes, mas com perfil molecular diferente, foi inesperado. Em primeiro lugar por não estar ainda descrita em Portugal continental nem na ilha da Madeira e depois, pelo facto de só recentemente ter sido descrita na literatura. Os resultados obtidos foram idênticos, independentemente do marcador molecular estudado (*18S* e *ITS-2*) e do tipo de abordagem escolhido para análise filogenética, quer por máxima verosimilhança, quer através da análise Bayesiana. A consistência dos grupos é suportada por valores elevados de *bootstrap*, indicando um nível elevado de confiança para cada agrupamento, e por sua vez a consistência e estabilidade dos ramos das árvores.

Relativamente ao gene *18S*, as diferenças observadas nas sequências nucleotídicas são poucas, daí os valores de *bootstrap* obtidos pelo método da máxima

verosimilhança não terem sido muito elevados. No entanto, a análise Bayesiana, um tipo de análise mais robusto, veio comprovar os resultados.

O gene *18S* do rDNA é muito conservado e é usado principalmente para análise supra-específica (Bargues *et al.*, 2007). Apresenta poucas variações em espécies muito semelhantes, o que constitui uma limitação (Stothard *et al.*, 2000). Por estas razões a sua validade na taxonomia e filogenia de algumas espécies moluscos lymnaeidicos tem sido questionada (Bargues *et al.*, 2001). Um dos exemplos foi a variabilidade intra e inter populacional encontrada em *L. natalensis* (Stothard *et al.*, 2000).

As sequências dos *ITS* (1 e 2), sendo regiões intergénicas, evoluem muito mais rapidamente do que a região *18S*, sendo bons marcadores para diferenciação das espécies. Em alguns casos permitem a caracterização de populações dentro da mesma espécie, nomeadamente nos moluscos lymnaeidicos (Bargues *et al.*, 2006, Bargues & Mas-Coma, 2005, Remigio & Blair, 1997). Neste estudo, com as sequências da região *ITS-2*, verificou-se uma clara separação entre os dois grupos filogenéticos, comprovando os resultados obtidos com as sequências do gene *18S* do rDNA, mas com uma maior robustez dos resultados, com elevados valores de *bootstrap*. O estudo da região *ITS-2*, permitiu ainda verificar que as amostras pertencentes à ilha da Madeira, que se inserem no ramo dos isolados de *L. schirazensis*, formam ainda um grupo geneticamente distinto dos outros isolados portugueses do mesmo grupo.

Foram detectados três haplotipos relativamente a cada marcador estudado. Um dos haplotipos (H1) corresponde às amostras que nas árvores filogenéticas aparecem no ramo de *L. truncatula* e dois haplotipos (H2 e H3) pertencem às amostras localizadas no ramo que inclui *L. schirazensis*. Destes dois haplotipos, um deles é referente às amostras do continente (H2) e o outro às da ilha da Madeira (H3). Relativamente ao gene *18S* foi encontrada diferença, um *gap* numa posição em duas amostras da ilha da Madeira, as quais se localizam no mesmo ramo da árvore filogenética dos isolados de *L. truncatula*. No entanto, por se tratar de um *gap*, a diferença não foi suficiente para ser considerado outro haplotipo. Seria assim necessário estudar mais amostras de *L. truncatula* com outro marcador molecular, referente a uma região menos conservada do genoma, como por exemplo a região *ITS-2* do rDNA.

Assim pode-se concluir que entre as amostras estudadas e identificadas morfológicamente como *L. truncatula*, algumas delas pertenciam a outra espécie, não

identificada até ao momento em Portugal continental nem na ilha da Madeira – *L. schirazensis*. Para além disso, detectaram-se dois haplotipos diferentes de *L. schirazensis*, um no continente e outro na ilha da Madeira, o qual é também geneticamente distinto de amostras de outras regiões, depositadas no “*GenBank*”.

As amostras foram também submetidas à análise pelas técnicas de RAPD-PCR e RFLP da região *ITS-2*. Os resultados foram sobreponíveis e revelaram a presença de dois perfis diferentes em qualquer das técnicas que, ao compará-los com a análise das sequências nuclotídicas, se verificou que as amostras que, nas árvores filogenéticas se localizavam no mesmo ramo das amostras de *L. truncatula* (“*GenBank*”) apresentaram perfil quer de RAPD-PCR quer de restrição diferente do observado nas amostras inseridas no ramo dos isolados de *L. schirazensis*. Ambas as técnicas apresentaram alguns resultados inconclusivos, devidos alguns perfis diferentes dos dois (4,7% na técnica de RAPD-PCR e 0,4% na técnica de PCR-RFLP) no entanto, se considerarmos que o perfil A corresponde às amostras de *L. truncatula* e perfil B às amostras de *L. schirazensis*, não houve incongruências nos resultados. Assim, podemos concluir que o marcador de RAPD-PCR - OPA2 (Stothard *et al.*, 2000) e PCR-RFLP com a enzima *HpaII*, são bons marcadores para distinção entre estas duas espécies lymnaeídicas.

Relativamente aos restantes marcadores de RAPD-PCR utilizados, não se obtiveram resultados passíveis de ser analisados. Assim, não foi estudada a variabilidade genética inter e intra-populacional. Este facto vem de encontro ao descrito na literatura. Apesar da técnica de RAPD-PCR ser muito usada em vários grupos de gastrópodes, ela não mostrou ser suficientemente conclusiva relativamente aos lymnaeídicos. Deve ser usada com muita cautela na análise taxonómica, devido à sua fraca reproductibilidade (Bargues *et al.*, 2001). No entanto, apresenta algumas vantagens práticas para detectar variações no DNA, pois é tecnicamente menos laboriosa, envolve menores custos e a técnica é relativamente rápida (Stothard & Rollinson, 1996).

Assim, e de acordo com os resultados da análise por RAPD-PCR e PCR-RFLP da região *ITS-2* do *rDNA* foi estabelecido um mapa dos locais onde se encontraram moluscos *L. schirazensis*, em Portugal continental e na ilha da Madeira (figuras 1 e 2).

Em Portugal continental *L. schirazensis* foi encontrada num campo de cultivo de arroz no vale do Mondego e na ribeira de Soure (distrito de Coimbra) assim como num

ribeiro em Estói (distrito de Faro) (Figura 57.). Aparentemente não existe qualquer relação entre estas duas regiões onde foram encontrados estes moluscos, dado que o distrito de Coimbra fica no centro do país e o distrito de Faro no sul, mostrando assim a dispersão dos moluscos e evidenciando a necessidade de um mapeamento mais completo desta espécie.

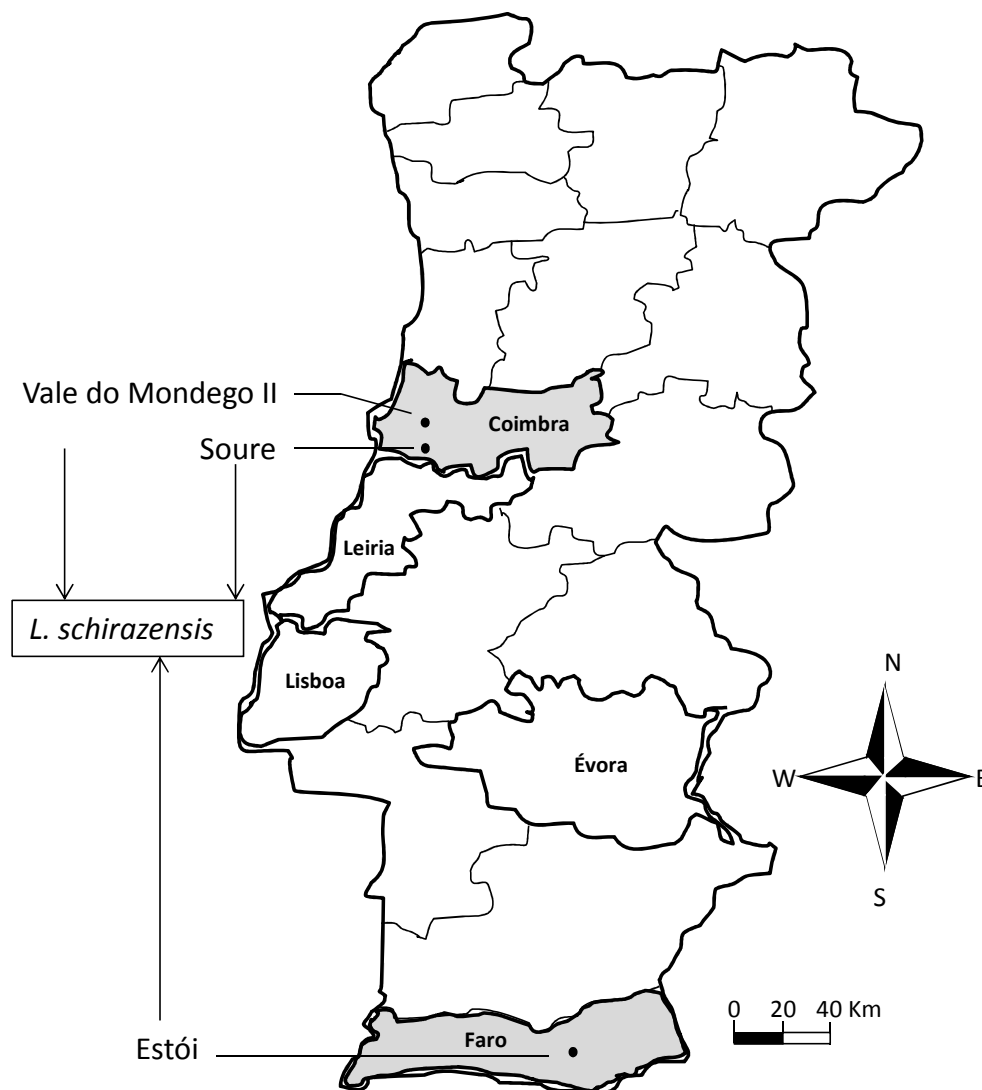


Figura 57. Mapa de Portugal continental, com indicação dos locais onde se colheram moluscos *L. schirazensis*.

Na ilha da Madeira os moluscos *L. schirazensis* foram colhidos em 4 habitats, Campo da Barca, Garachico, Quinta Grande e S. Roque da Fundoa, todos eles na região sul da ilha. No entanto, não há qualquer relação de proximidade entre eles, sendo locais bem distintos (Figura 58).

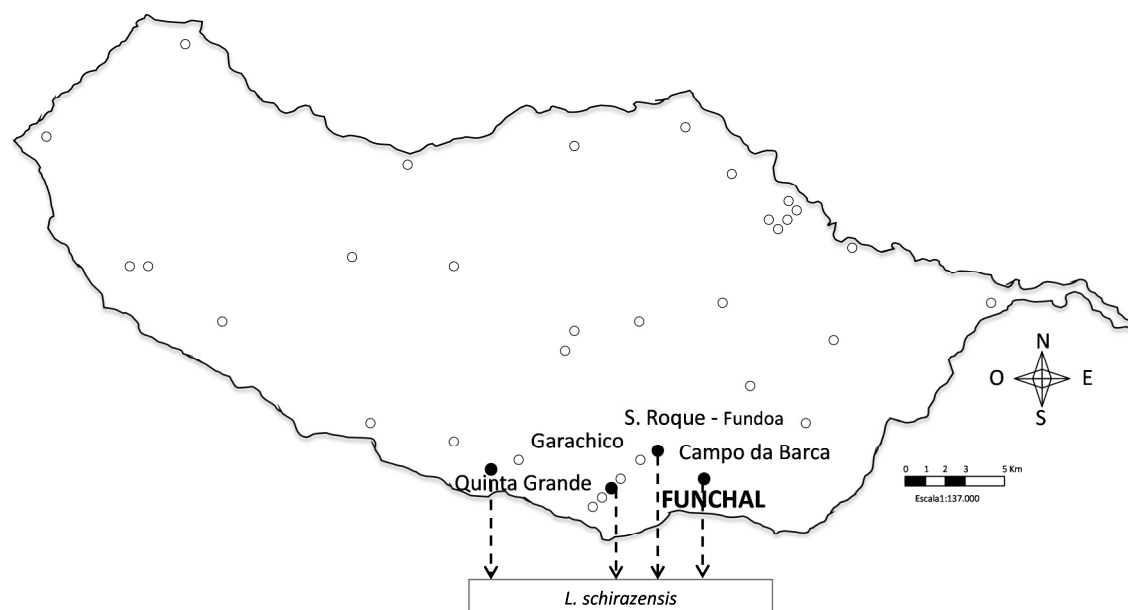


Figura 58. Mapa da ilha da Madeira com indicação dos locais estudados (○) e onde se colheram moluscos da espécie *L. schirazensis*(●).

Lymnaea (s.l.) schirasensis Küster, 1862, é uma espécie que se pensa ser originária de Shiraz, no Irão, onde foi originalmente descrita, e, à semelhança do verificado com *L. truncatula*, apresenta características anfíbias marcadas, frequentes em habitats antropofílicos e normalmente estão presentes numa grande variedade de altitudes. Apesar de anfíbios, os moluscos desta espécie apresentam uma elevada preferência por estar fora de água. Normalmente não são encontradas dentro de água, mas sim na vegetação e na lama adjacente ao curso de água, geralmente nas margens de rios ou ribeiros de água corrente (Bargues *et al.*, 2011a). Segundo Bargues *et al.* (2011a), trata-se de uma espécie geneticamente diferente mas fenotipicamente muito semelhante a *L. truncatula* (Bargues, 2012). Estas espécies são frequentemente confundidas com *L. truncatula* e/ou outras espécies de *Lymnaea* semelhantes em todos os continentes.

É uma espécie amplamente distribuída pelo mundo inteiro: Mar Cáspio, Irão, Afeganistão, Georgia, Arménia, Azerbaijão, Delta do Nilo (Egipto), Espanha, Lima e Cajamarca (Peru), Equador, México e Venezuela (Kijashko, 2009 , Bargues *et al.*, 2011a).

Normalmente esta espécie nunca se encontra isoladamente num habitat. Aparece quase sempre em associação com outras espécies lymnaeídicas, muito semelhantes, como é o caso do grupo *Galba/Fossaria*. Em vários locais do Velho Mundo, como Irão, Egipto e Espanha, encontram-se associados a *L. truncatula*. No Novo Mundo, no México e Caribe (República Dominicana), encontram-se nos mesmos habitats de *L. cubensis*, noutras regiões do México, com *L. humilis* e na América do sul (Venezuela, Equador e Peru) com *L. truncatula*, *L. cubensis*, *L. cousini* e *L. neotropica* (Bargues *et al.*, 2011a).

L. schirazensis ainda não foi encontrada naturalmente infectada com *F. hepatica*, e em infecção laboratorial com *F. hepatica* e *F. gigantica* nunca houve produção de cercárias. No entanto, a existência de uma espécie “*L. truncatula-like*”, traz algumas implicações para a fasciolose, podendo até esclarecer algumas dúvidas relacionadas com a transmissão do parasita. Segundo Bargues *et al.* (2011a) trata-se de um importante biomarcador do movimento dos animais, de uma região para a outra, o que é muito importante na disseminação e emergência da parasitose. Um exemplo disso é a introdução da fasciolose na República Dominicana, onde não existe *L. truncatula*. Esta espécie é ainda um bom modelo para estudos de genómica e proteómica sobre susceptibilidade/resistência à infecção por *F. hepatica*, tornando-se num objecto importante para o estudo do controlo da parasitose (Bargues *et al.*, 2011a).

Apesar de terem sido encontrados moluscos *L. schirazensis* em vários habitats em Portugal continental e na ilha da Madeira (três e quatro respectivamente), pensamos que este número pode estar a ser subestimado, uma vez que se estudaram poucas amostras de cada habitat. Dado que estes moluscos não existem isoladamente em cada habitat, mas sim associados a *L. truncatula*, teriam que ser estudados mais moluscos e assim obter um mapeamento mais preciso desta espécie.

6. Conclusões

Os resultados obtidos permitiram-nos demonstrar a importância que a biologia molecular tem na identificação taxonómica dos moluscos lymnaeídicos de Portugal continental e na Ilha da Madeira, assim como perceber qual a posição filogenética ocupada pelos moluscos estudados em relação a outros da mesma espécie de diferentes regiões.

Assim, além de *L. truncatula* foi detectada a presença de uma espécie lymnaeídica, *Lymnaea schirazensis*, geneticamente diferente mas fenotipicamente muito semelhante a *L. truncatula*. *L. schirazensis* Esta espécie foi identificada pela primeira vez em Portugal continental e na ilha da Madeira. Em Portugal continental, foram encontrados moluscos num campo de cultivo de arroz no vale do Mondego e na ribeira de Soure (distrito de Coimbra) assim como num ribeiro em Estoi (distrito de Faro). Na ilha da Madeira foi encontrada no Campo da Barca, em Garachico, na Quinta Grande e S. Roque da Fundoa, localidades da região sul da ilha.

Foram detectados dois haplotipos diferentes de *L. schirazensis*, um onde se incluem os moluscos do continente e outro, relativo aos moluscos da ilha da madeira. Os moluscos *L. schirazensis* da ilha da Madeira mostraram ser geneticamente mais distantes quer dos moluscos do continente, quer de outros pertencentes a várias regiões do globo, cujas sequências foram obtidas do “GenBank”.

Com o objectivo de avaliar a presença ou não de mais do que um haplotipo de *L. truncatula*, seria necessário estudar as amostras colhidas em Portugal continental e na ilha da Madeira com outro marcador molecular referente a uma região menos conservada do genoma, como por exemplo a região *ITS-2* do *rDNA*.

O marcador de RAPD-PCR - OPA2 (Stothard *et al.*, 2000) e PCR-RFLP com a enzima *HpaII*, são bons marcadores para distinção entre *L. truncatula* e *L. schirazensis*, revelando perfis de RAPD-PCR e de restrição específicos para cada espécie.

Capítulo III

Potenciais hospedeiros
intermediários de *Fasciola* sp –
Lymnaea (Pseudosuccinea)
columella na Ilha da Madeira –
Primeiro registo

1. Introdução

A pesar da importância dos moluscos da espécie *Lymnaea truncatula* como hospedeiros intermediários de *F. hepatica*, existem dentro do género *Lymnaea* e, dependendo da região do globo e das condições bióticas e abióticas necessárias para o desenvolvimento do ciclo de vida daquele parasita, várias outras espécies de moluscos lymnaeídicos podem desempenhar essa função (Tabela 1.).

Na ilha da Madeira, pelas indicações obtidas, através das escassas publicações relativas aos moluscos de água doce ali existentes, a única espécie registada dentro do género *Lymnaea*, era *L. truncatula*. A estes moluscos era atribuído o papel de hospedeiros intermediários de *F. hepatica*. No entanto, após os inquéritos malacológicos realizados naquela ilha (citados nos capítulos I e II), foram encontrados moluscos lymnaeídicos que eram diferentes de *L. truncatula*, e de *L. schirazensis*, (descrita no capítulo II), os quais foram identificados como *Lymnaea* sp.

2. Objectivos

- Determinar a espécie dos moluscos lymnaeídicos, previamente identificados como *Lymnaea* sp, recorrendo a caracteres morfológicos e moleculares.

3. Material e métodos

3.1. Moluscos

Moluscos *Lymnaea* sp colhidos na ilha da Madeira.

3.2. Análise morfológica

A análise morfológica incluiu a concha e a rádula dos moluscos, seguindo o descrito por Hubendick (1951).

3.3. Análise molecular

3.3.1. Extração de DNA

O DNA total foi extraído da região cefalopodal (formada pela cabeça e pelo pé do molusco) com CTAB (descrição no capítulo II).

3.3.2. Amplificação de gene *16S* do DNA mitocondrial (*mtDNA*)

O gene *16S* foi amplificado usando SeqIn desenhadas por (Pip & Franck, 2008) (*16S* Fwd 5' – CGC CTG TTT ATC AA AAC AT – 3' / *16S* Rvs 5' – CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T – 3').

A PCR foi efectuada recorrendo ao Kit - Illustra™ PuReTaq™ Ready-To- Go™ PCR Beads (GE-Healthcare) e efectuada num termociclador “Primus evolution 96 Gradient”.

Utilizaram-se para cada reacção, 0,5 µl de DNA (amostra), 10 pmol de cada SeqIn e 22,5 µl de água ultra pura (18,2 MΩ.cm). Foi sempre utilizado um controlo negativo, processado com as amostras, com a diferença de que a amostra foi substituída por água.

As amostras foram sujeitas a uma etapa de desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 37 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 54°C e 2 minutos a 72°C. No final, a extensão das sequências foi efectuada a 72°C durante 5 minutos. O produto da PCR (5 µl) após adição de 3 µl de tampão de deposição foi submetido a electroforese num gel de agarose a 1,5% (m/v), corado com Brometo de etídio. Após separação observou-se a fluorescência emitida num documentador de imagem AlphaImager HP (Alpha Innotech).

3.3.3. Amplificação do gene Citocromo Oxidase I (*COI*) do *mtDNA*

O gene *COI* foi amplificado usando SeqIn *COI* Fwd 5' – GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G – 3' / *COI* Rvs 5' – TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA – 3' (Folmer *et al.*, 1994).

A PCR foi efectuada recorrendo ao Kit - Illustra™ PuReTaq™ Ready-To-Go™ PCR Beads (GE-Healthcare) e efectuada num termociclador “Primus evolution 96 Gradient”.

Utilizaram-se para cada reacção, 0,5 µl de DNA (amostra), 10 pmol de cada SeqIn e 22,5 µl de água ultra pura (18,2 MΩ.cm). Foi sempre utilizado um controlo negativo, processado com as amostras, com a diferença de que a amostra foi substituída por água.

As condições da PCR foram as descritas por Folmer *et al.* (1994) e optimizadas para as amostras estudadas. A desnaturação inicial foi efectuada a 95°C por 5 minutos, seguida de 37 ciclos de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 58°C e 90 segundos a 72°C. Por fim, a extensão das sequências, a 72°C durante 5 minutos.

O produto da PCR (5 µl) após adição de 3 µl de tampão de deposição foi submetido a electroforese num gel de agarose a 1,5% (m/v), corado com Brometo de etídio. Após separação observou-se a fluorescência emitida num documentador de imagem AlphaImager HP (Alpha Innotech).

3.3.4. Purificação e sequenciação

Os produtos de PCR foram purificados usando colunas de purificação QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, USA).

As reacções de sequenciação foram efectuadas num sequenciador automático comercial, na empresa STABvida. As SeqIn usadas para a sequenciação, foram as mesmas que se utilizaram na PCR inicial e as amostras foram sequenciadas nos dois sentidos (3'/5' e 5'/3').

Dado que o objectivo era apenas o de proceder à identificação taxonómica destes moluscos foram estudados somente 6 exemplares. Dos moluscos colhidos na ilha da Madeira, e previamente identificados (morfologicamente) como *L. truncatula*, foram estudados dois exemplares que serviram como controlo.

3.3.5. Análise Filogenética

As sequências nucleotídicas obtidas para os genes em estudo (*16S* e *COI* do *mtDNA*) (Anexos 5 e 6) foram alinhadas e editadas com o apoio do programa *BioEdit* versão 7.1.3.0 (Hall, 1999), e analisadas através do programa “*Basic Local Alignment Search Tool - (Blast)*” (disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), o que permitiu a pesquisa de sequências semelhantes depositadas na base de dados, “*Genbank*”.

Os estudos de inferência filogenética foram realizados com o auxílio do programa “*Mega*” 5.05 (Tamura *et al.*, 2011), o qual seleccionou o modelo mais apropriado para elaboração das árvores (Anexos 9 e 10).

Na construção das árvores filogenéticas, para além das amostras recolhidas na ilha da Madeira, foram também utilizadas 2 amostras de moluscos lymnaeídeos colhidos na ilha de Santiago – Arquipélago de Cabo Verde, previamente identificados como *L. natalensis*.

A análise filogenética do gene *16S* foi efectuada usando o método da máxima verosimilhança baseada no modelo de Tamura três-parametros (Tamura, 1992). A árvore foi elaborada com base no logaritmo de verosimilhança mais elevado (-902.8519). Foram eliminados todos os *gaps* eventualmente presentes nas sequências.

A análise filogenética do gene *COI* foi efectuada usando o método da máxima verosimilhança baseada no modelo de Hasegawa-Kishino-Yano (Hasegawa *et al.*, 1985). A árvore apresentada foi a que evidenciou um logaritmo de verosimilhança mais elevado (-1759.9278). Foram eliminados todos os *gaps* eventualmente presentes nas sequências.

4. Resultados

4.1. Inquérito malacológico

Dos 1409 moluscos Gastropoda de água doce colhidos nos 36 habitats (Figura 59), 874 eram *L. truncatula* e 133 de *Lymnaea* sp.



Figura 59. Mapa da Ilha da Madeira: ○ Localização dos habitats estudados ● Habitats com *Lymnaea* sp.

Lymnaea sp foi encontrada em 6 dos 36 habitats estudados (Capítulo I) distribuídos por toda a ilha. (Figura 59),



Figura 60. Habitats de *Lymnaea* sp: a) EENC; b) Canal de irrigação; c) Ribeiro. Original P. Ferreira.

O tipo daqueles 6 habitats variou entre ribeiros, EENC e canais de irrigação (Figura 60). Os moluscos encontravam-se maioritariamente fixos às plantas do habitat (Figura 61).



Fig. 61. Moluscos *Lymnaea* sp fixos às plantas to habitat (original P. Ferreira)

4.2. Análise morfológica

Considerando as morfologias da concha (Figura 62) e da rádula (Figura 63), *Lymnaea* sp apresentou maior semelhança com *L. natalensis* (syn. *Radix natalensis*).



Figura 62. Morfologia da concha de *Lymnaea* sp (original P. Ferreira).

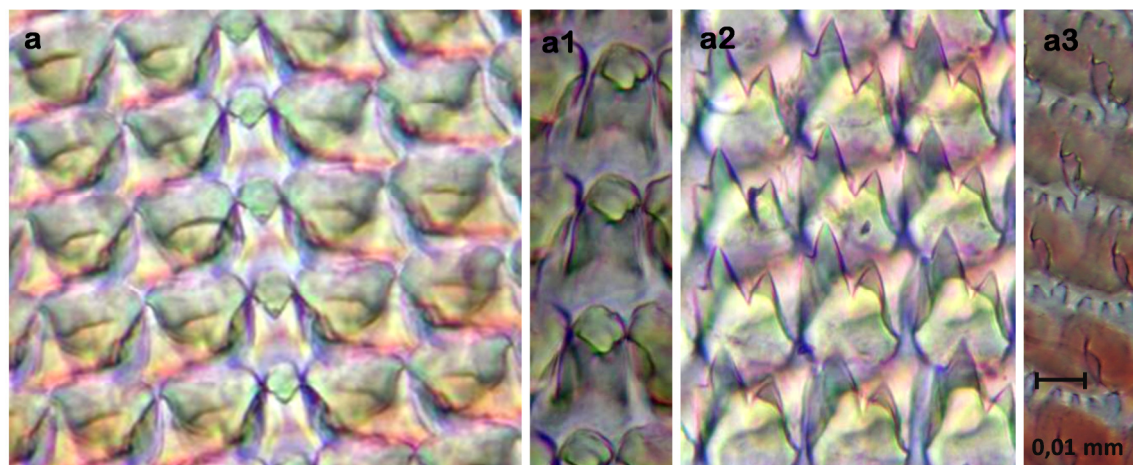


Figura 63. Morfologia da rádula de *Lymnaea* sp, a1) Dentes centrais, a2) Dentes intermédios, a3) Dentes marginais

4.3. Amplificação e sequenciação dos genes *16S* e *COI* do *mtDNA*

Após amplificação dos genes *16S* e *COI*, obtiveram-se fragmentos de DNA de aproximadamente 400/500 (Figura 64a) e 600/700 (Figura 64b) pares de bases respectivamente.

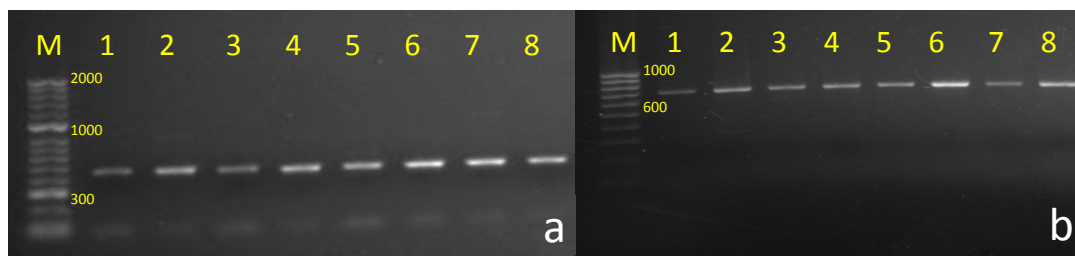


Figura 64. Resultados da amplificação dos genes *16S* (a) e *COI* (b)

A análise por biologia molecular, dos dois moluscos, previamente identificados como *L. truncatula* através da morfologia da concha, e após comparação das suas sequências de *COI* e *16S* com outras existentes no “NCBI (National Center for Biotechnology Information) GenBank”, por análise BLAST®, apresentou resultados diferentes entre os dois exemplares. Num dos casos confirmou-se uma maior homologia com *Lymnaea* (*Galba*) *truncatula*, enquanto no outro caso a maior homologia foi observada com as sequências de moluscos classificados como *L. schirazensis*.

Por outro lado, os moluscos identificados como *Lymnaea* sp, apresentaram uma maior homologia com *Pseudosuccinea columella* [syn. *Lymnaea columella* e *L. (Pseudosuccinea) columella*].

Os resultados relativos aos dois moluscos de Cabo Verde, confirmaram a classificação morfológica – *Lymnaea (Radix) natalensis*.

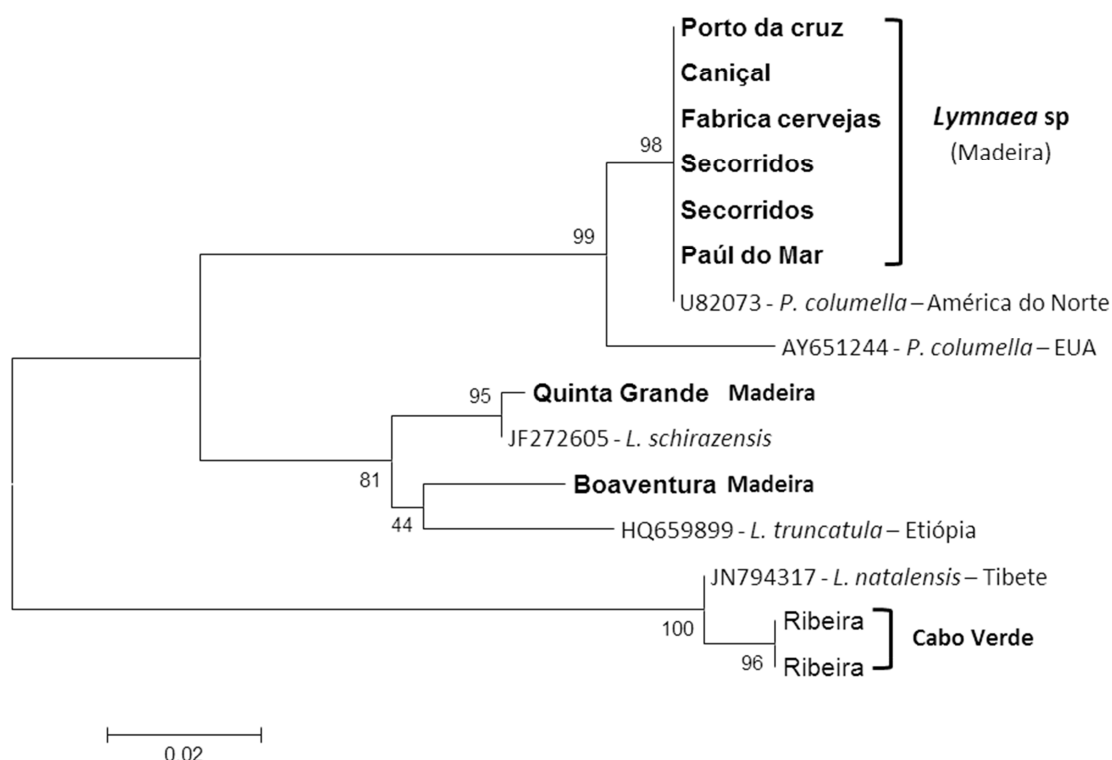


Figura 65. Análise filogenética do gene *16S* do *mtDNA*, pelo método da máxima verosimilhança.

Com as árvores obtidas relativamente aos dois genes estudados (Figuras 65 e 66), é possível observar que cada espécie de moluscos em estudo, se insere em ramos distintos da árvore e bem separados. Os resultados apresentam valores de *bootstrap* bastante elevados, quase todos superiores a 80%. A separação entre as duas sequências de *L. truncatula* é a única que apresenta um valor baixo, 44.

Relativamente à *Lymnaea* sp, colhida na Ilha da Madeira, em ambas as árvores foram incluídas nos ramos da árvore, juntas com *P. columella*. A inclusão dos moluscos *Lymnaea* sp, colhidos na Ilha da Madeira, no ramo *P. columella* colhidas noutras

regiões (Colômbia, Australia, EUA), parece ser um resultado muito robusto devido ao elevado valor de *bootstrap*, 99%

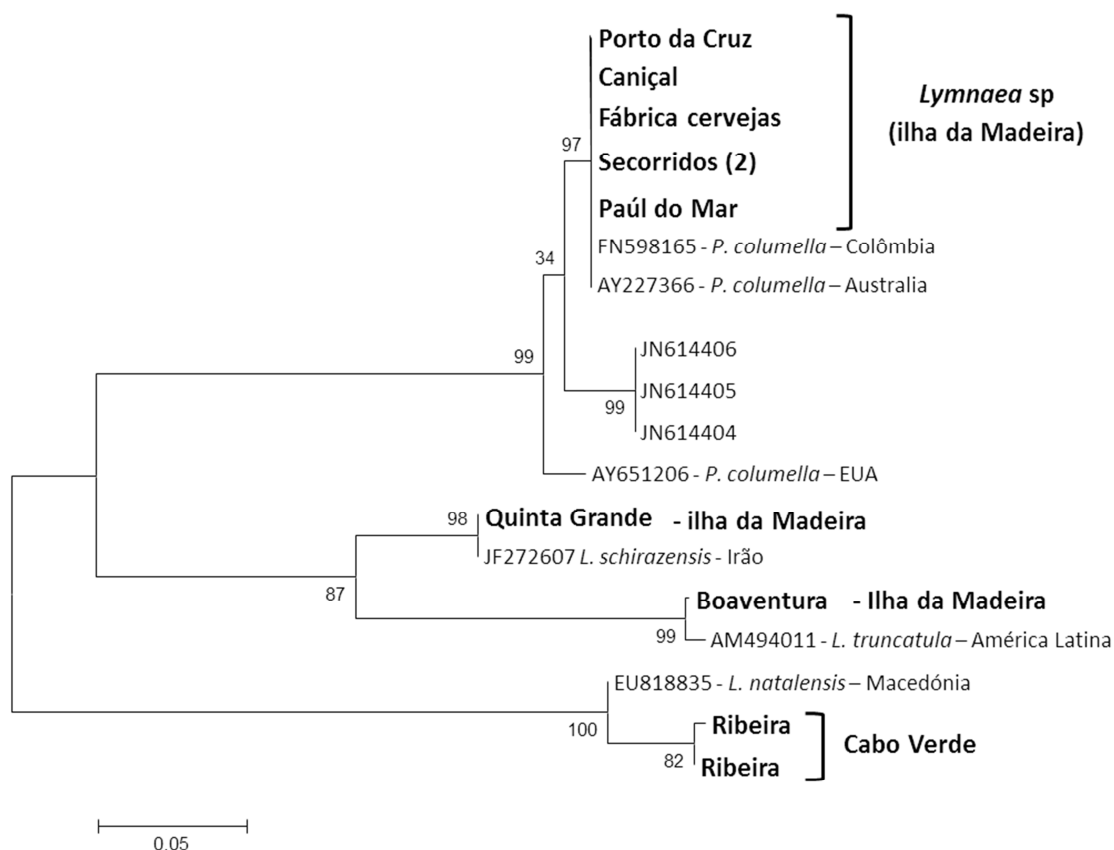


Figura 66. Análise filogenética do gene *COI* do *mtDNA*, pelo método da máxima verosimilhança.

5. Discussão

De acordo com os resultados obtidos com os estudos de biologia molecular, nomeadamente através da sequenciação dos genes *16S* e *COI* do *mtDNA*, podemos concluir que os moluscos *Lymnaea* sp, colhidos na Ilha da Madeira pertencem à espécie *Lymnaea* (*Pseudosuccinea*) *columella* Say 1817 (Gastropoda, Lymnaeidae). Os valores de *bootstrap* obtidos são muito elevados (99%), demonstrando uma elevada representatividade da árvore filogenética e, por conseguinte, a consistência dos resultados.

A identificação de *L. (Pseudosuccinea) columella* (*syn. Lymnaea columella*) na ilha da Madeira reveste-se de uma particular importância, devido a ser também um dos hospedeiros intermediários de *F. hepatica* em várias regiões do globo (Ueta, 1976, de Souza *et al.*, 2002, Magalhães *et al.*, 2004, Prepelitchi *et al.*, 2003, Abílio & Watanabe, 1998, Pointier *et al.*, 2007, Paraense, 1983), nomeadamente nas Américas do Norte e Central, Africa, Austrália e Nova Zelândia. Por outro lado, actua igualmente como hospedeiro intermediário de *F. gigantica* na costa norte do golfo do México (Bargues & Mas-Coma, 2005). *L. columella* Say (1817) parece ser uma espécie originária do continente americano, mais propriamente nas regiões Norte e Central, tendo posteriormente introduzida nos cinco continentes (Bargues and Mas-Coma, 2005, Gloer and Sîrbu, 2005). Esta espécie de molusco, actua como hospedeiro intermediário de *F. hepatica*. Trata-se de uma espécie com elevada capacidade de colonizar novos habitats devido à sua grande tolerância às condições ambientais (Prepelitchi *et al.*, 2011). Segundo (Harris & Charleston, 1977b) com maior capacidade de tolerância às temperaturas que, inclusive, *L. truncatula*. Apresenta igualmente capacidade de estivação e sobrevivência em condições de elevadas temperaturas e de seca (Harris & Charleston, 1977a). Por outro lado, o facto de permanecerem mais tempo dentro de água do que *L. truncatula*, aumenta a sua probabilidade de contacto com as formas larvares do parasita (miracídios), caso estejam presentes, e, consequentemente, o risco de infecção e transmissão da doença (Prepelitchi *et al.*, 2011).

Este novo registo na ilha da Madeira, por si só justifica a sua importância devido ao potencial desta espécie de gastrópodes de água doce como hospedeiro intermediário, tanto de *F. hepatica* como de *F. gigantica*. Neste estudo, foi efectuada a pesquisa de possível infecção por *F. hepatica* quer pela indução de eliminação de cercarias, após

exposição a uma fonte de luz artificial, quer por pesquisa de DNA do parasita no molusco, o que se encontra descrito em detalhe no capítulo I. Outro factor, da maior relevância, é a forma como estes moluscos se distribuem ao longo da ilha, não se encontrando confinados apenas a um ponto da ilha mas sim em locais bem distintos situados em extremos completamente opostos, como se observa na Figura 1. Considerando que a Ilha da Madeira é uma região onde existe fluxo populacional, inclusive de zonas onde existem descritos casos de fasciolose por *F. hepatica* e por *F. gigantica*, aumenta assim o risco de transmissão da doença. Além das semelhanças observadas na morfologia da concha e da rádula do molusco, outra das razões que, inicialmente, levaram a pensar que os moluscos identificados como *Lymnaea* sp, pudessem ser *Lymnaea natalensis* Krauss 1848, foi a proximidade da ilha da Madeira com África, onde esta espécie de moluscos está presente e inclusive é o hospedeiro intermediário de *F. gigantica* em várias regiões deste continente (Mas-Coma *et al.*, 2005).

Outro resultado que merece algum destaque, neste capítulo, é o facto de a presença de *L. schirazensis* ter sido confirmada pelos genes *16S* e *COI* do *mtDNA*, apoiando os dados apresentados no capítulo anterior relativamente à identificação da *L. schirazensis* na Ilha da Madeira (sequenciação do gene *18S* e da região *ITS-2*, RFLP do *ITS-2* e RAPD-PCR).

Mais uma vez ficou aqui bem patente a dificuldade na identificação taxonómica dos moluscos lymnaeídeos devida, sobretudo à elevada variabilidade intraespecífica e inexistência de características-chave, exclusivas de cada espécie que leve à inclusão/exclusão em cada grupo taxonómico (Bargues *et al.*, 2011b, Carvalho *et al.*, 2004).

6. Conclusões

Com este estudo podemos concluir que as técnicas de biologia molecular, com diferentes marcadores moleculares, são “ferramentas” muito úteis para complementar o estudo dos caracteres morfológicos, no estudo dos moluscos hospedeiros intermediários de helmintas que parasitam os humanos e os animais domésticos. A sua utilização é de extrema importância na monitorização da disseminação dos moluscos para posteriormente estimar factores de risco para a introdução da parasitose a eles associada e, eventualmente, para implantação de medidas de controlo.

Foi aqui reportada, pela primeira vez, a presença de *L. (Pseudosuccinea) columella* (syn. *Lymnaea columella*), havendo assim uma segunda espécie de *Lymnaea* com potencial de hospedeiro intermediário de *F. hepatica*, a par da já conhecida, como existente, *L. truncatula*, o que vem trazer um risco adicional para o desenvolvimento de endemidade para a fasciolose na ilha da Madeira.

Quanto à infecção destes moluscos por *F. hepatica*, verificou-se a ausência de eliminação de cercárias, no entanto, dado que na pesquisa de DNA parasitário por PCR se obteve amplificação de um fragmento de DNA, falta saber de que espécie se trata (sequenciação em curso).

Conclusões gerais

Conclusões

Capítulo I

Relativamente ao continente, os habitats onde se encontraram moluscos *L. truncatula* foram predominantemente: ribeiros de carácter “Temporário”, com “Pouca” vegetação na margem, vegetação “Leve” nas colecções de água e do tipo “Emergente e Imersa”, com substrato composto por “Argila e Matéria em decomposição” e com água “Límpida”, “Incolor” e “Inodora”. Quanto à densidade populacional de *L. truncatula* parece ser:

- a) Influenciada pelo carácter da vegetação presente na água dos habitats, havendo uma preferência pela vegetação leve;
- b) Afectada negativamente pela concentração de nitratos, diminuindo à medida que os valores de nitratos aumentam;
- c) Influenciada pelas concentrações de sulfatos e de dureza total na água, com os valores preferenciais entre 200,1/300 mg/l e entre 178,1/267 mg/l respectivamente;
- d) Influenciada positivamente pela concentração de cálcio na água até valores na ordem dos 25,1/50 mg/l. Concentrações superiores parecem ser prejudiciais ao desenvolvimento dos moluscos;
- e) Afectada negativamente por outras espécies de moluscos presentes, como *P. metidjensis*, *L. peregra* e moluscos da subclasse Prosobronchiata.

Na ilha da Madeira, os habitats de *L. truncatula* foram predominantemente: do tipo “Escorrimentos de encosta” de carácter “Permanente”, com “Fraca” exposição solar, com “Pouca” vegetação na margem, vegetação “Leve” nas colecções de água e do tipo “Emergente”, com substrato composto por “Rocha, Argila e Matéria em decomposição” e com água “Límpida”, “Incolor” e “Inodora”. A densidade populacional de *L. truncatula* parece ser:

- a) Influenciada pelo tipo da vegetação presente na água dos habitats;
- b) Condicionada pela temperatura da água dos habitats, não se encontrando moluscos em temperaturas abaixo dos 14,4°C;
- c) Afectada negativamente pela concentração de nitratos na água, diminuindo à medida que os valores de nitratos aumentam;

- d) Favorecida com o aumento das concentrações de cálcio na água.

Não se observou eliminação de cercarias de *F. hepatica*, nem de qualquer outro trematode por parte dos moluscos colhido quer no continente quer na ilha da Madeira. A pesquisa de DNA de *F. hepatica*, por PCR, nos moluscos *L. truncatula* revelou-se negativa. Quanto aos moluscos *L. columella*, obteve-se amplificação de um fragmento de DNA, comum às 3 amostras estudadas, cuja sequenciação se encontra em curso.

A análise de fezes de animais, presentes junto às colecções de água, foi negativa em todas as amostras.

Foi encontrado um parasita *F. hepatica* no fígado de um gamo da Tapada Nacional de Mafra (distrito de Lisboa)

Capítulo II

Foi identificada pela primeira vez em Portugal continental e na ilha da Madeira uma espécie lymnaeídica, geneticamente diferente mas fenotipicamente muito semelhante a *L. truncatula* – *Lymnaea schirazensis*. Dentro dos moluscos pertencentes a esta espécie foram detectados dois haplotipos diferentes de *L. schirazensis*, um onde se incluem os moluscos do continente (semelhantes a outros pertencentes a várias regiões do globo), e outro, geneticamente mais distante, relativo aos moluscos da ilha da Madeira.

O marcador de RAPD-PCR - OPA2 (Stothard *et al.*, 2000) e PCR-RFLP com a enzima *HpaII*, são bons marcadores para distinção entre *L. truncatula* e *L. schirazensis*, revelando perfis de RAPD-PCR e de restrição específicos para cada espécie.

Capítulo III

Foi aqui reportada, pela primeira vez, a presença de *L. (Pseudosuccinea) columella* (*syn. Lymnaea columella*), uma segunda espécie de *Lymnaea* com potencial de hospedeiro intermediário de *F. hepatica*, a par da já conhecida, como existente, *L. truncatula*.

Bibliografia

Bibliografia

- ABÍLIO, F. G. P. & WATANABE, T. 1998. Ocorrência de *Lymnaea columella* (Gastropoda: Lymnaeidae), hospedeiro intermediário da *Fasciola hepatica*, para o Estado da Paraíba. Brasil. *Revista de Saúde Pública*, 32, 448-456.
- ABROUS, M., RONDELAUD, D. & DREYFUSS, G. 1999. *Paramphistomum daubneyi* and *Fasciola hepatica*: influence of temperature changes on the shedding of cercariae from dually infected *Lymnaea truncatula*. *Parasitology Research*, 85, 765-769.
- ABROUS, M., RONDELAUD, D. & DREYFUSS, G. 2000. Cercarial productivity of redial generations in single-miracidium infections of *Lymnaea truncatula* with *Paramphistomum daubneyi* or *Fasciola hepatica*. *Journal of Helminthology* 74, 1-5
- ALMEYDA-ARTIGAS, R. J., BARGUES, M. D. & MAS-COMA, S. 2000. ITS-2 rDNA sequencing of *Gnathostoma* species (Nematoda) and elucidation of the species causing human gnathostomiasis in the Americas. *Journal of Parasitology*, 86, 537-544.
- AMARISTA, M., NIQUIL, N., BALZAN, C. & POINTIER, J.-P. 2001. Interspecific competition between freshwater snails of medical importance: a Venezuelan example. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie*, 324, 143-148.
- ANGLES, R., STRAUSS, W., RAMIREZ, S., ESTEBAN, J. G. & MAS-COMA, S. 1997. Human fascioliasis in Bolivia: coprological surveys in different provinces of the department of La Paz. *Research and Reviews in Parasitology*, 57, 33-37.
- ARNER, J., P.VILA & PLAUTZ, C. Z. 2009. Effects of Local Water Contaminants on the Development of Aquatic Organisms. *SUJUR* 1, 12-26.
- AZIZ, M. A. & RAUT, S. 1996. Thermal effect on the life-cycle parameters of the medically important freshwater snail species *Lymnaea (Radix) luteola* (Lamarck). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 91, 119-128.
- BALDWIN, B. G. 1992. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the compositae. *Mol Phylogenet Evol.* , 1, 3-16.

- BARATA, M. C. S. 1987 (1989). Sobre a existência de *Fasciola hepatica* L., 1758, em animais silvestres da Tapada Nacional de Mafra - Estudo preliminar. *Garcia de Orta, Ser. Zool., Lisboa*, 14, 29-33.
- BARBER, K. E., MKOJI, G. M. & LOKER, E. S. 2000. PCR-RFLP analyssi of the ITS2 region to identify *Schistosoma haematobium* and *S. bovis* from Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 62, 434–440.
- BARBOSA, F. S., COSTA, D. P. P. D. & ARRUDA, F. 1983. Competitive interactions between species of freshwater snails: I. Laboratory: Ia. General methodology. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 78, 335-341.
- BARGUES, M. D. & MAS-COMA, S. 1997. Phylogenetic Analysis of Lymnaeid Snails Based on 18s rDNA Sequences. *Mol. Biol. Evol.* , 14, 569-577
- BARGUES, M. D. & MAS-COMA, S. 2005. Reviewing lymnaeids vectors of fascioliasis by ribossomal DNA sequence analyses. *Journal of Helminthology*, 79, 257–267.
- BARGUES, M. D. DNA assessment of fossarine vectors of fascioliasis: differences between the Americas and Europe, with emphasis on *Lymnaea schirazensis*. . European Multicolloquium of Parasitology (EMOP XI), 25-29 July 2012 Romania.
- BARGUES, M. D., ARTIGAS, P., KHOUBBANE, M. & MAS-COMA, S. 2011b. DNA sequence characterization and phylogeography of *Lymnaea cousini* and related species, vectors of fascioliasis in northern Andean countries, with description of *L. meridensis* n. sp. (Gastropoda: Lymnaeidae). *Parasites & Vectors*, 4, 132.
- BARGUES, M. D., ARTIGAS, P., KHOUBBANE, M., FLORES, R., GLOER, P., ROJAS-GARCIA, R., ASHRAFI, K., FALKNER, G. & MAS-COMA, S. 2011a. *Lymnaea schirazensis*, an overlooked snail distorting fascioliasis data: genotype, phenotype, ecology, worldwide spread, susceptibility, applicability. *PLoS ONE*, 6, e24567.
- BARGUES, M. D., ARTIGAS, P., MERA Y SIERRA, R. L., POINTIER, J. P. & MAS-COMA, S. 2007. Characterisation of *Lymnaea cubensis*, *L. viatrix* and *L. neotropica* n. sp., the main vectors of *Fasciola hepatica* in Latin America, by

- analysis of their ribosomal and mitochondrial DNA. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 101, 621-641.
- BARGUES, M. D., COMA, S. M., SIERRA, R. L. M. Y., GÓMEZ, H. G. & ARTIGAS, P. 2006. Ribosomal DNA ITS-1 sequencing of *Galba truncatula* (Gastropoda, Lymnaeidae) and its potential impact on fascioliasis transmission in Mendoza, Argentina. *Animal Biodiversity and Conservation*, 29, 191-194.
- BARGUES, M. D., GONZÁLEZ, L. C., ARTIGAS, P. & MAS-COMA, S. 2011c. A new baseline for fascioliasis in Venezuela: lymnaeid vectors ascertained by DNA sequencing and analysis of their relationships with human and animal infection. *Parasites & Vectors*, 4, 1-18.
- BARGUES, M. D., VIGO, M., HORAK, P., DVORAK, J., PATZNER, R. A., POINTIER, JACKIEWIEZ, M., MEIER-BROOK, C. & MAS-COMA, S. 2001. European Lymnaeidae (Mollusca: Gastropoda), intermediate hosts of trematodiasis, based on nuclear ribosomal DNA ITS-2 sequences. *Infection, Genetics and Evolution* 1, 85-107.
- BORAY, J. C. 1969. Experimental Fascioliasis in Australia. *Advances in Parasitology*, 7, 95-210.
- BOWLES, J., BLAIR, D. & MCMANUS, D. P. 1995. A Molecular Phylogeny of the Human Schistosomes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 4, 103-109.
- BRÖNMARK, C., RUNDLE, S. & ERLANDSSON, A. 1991. Interactions between freshwater snails and tadpoles: competition and facilitation. *Oecologia*, 87, 8-18.
- BROWN, D. 1994. *Freshwater Snails of Africa and their Medical Importance*. , Taylor & Francis.
- CALDEIRA, R. L., CARVALHO, O. S., MENDONÇA, C. L., GRAEFF-TEIXEIRA, C., SILVA, M. C., BEN, R., MAURER, R., LIMA, W. S. & LENZI, H. L. 2003. Molecular differentiation of *Angiostrongylus costaricensis*, *A. cantonensis*, and *A. vasorum* by polymerase chain reaction- restriction fragment length polymorphism. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98, 1039-1043.
- CALDEIRA, R. L., VIDIGAL, T. H., MATINELLA, L., SIMPSON, A. J. & CARVALHO, O. S. 2000. Identification of planorbids from Venezuela by polymerase chain reaction amplification and restriction fragment length

- polymorphism of internal transcriber spacer of the RNA ribosomal gene. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95, 171-177.
- CALDEIRA, R. L., VIDIGAL, T. H., PAULINELLI, S. T., SIMPSON, A. J. & CARVALHO, O. S. 1998. Molecular identification of similar species of the genus *Biomphalaria* (Mollusca: Planorbidae) determined by a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93, 219-225.
- CALIENES, A. F., FRAGA, J., POINTIER, J.-P., YONG, M., SANCHEZ, J., COUSTAU, C., GUTIERREZ, A. & THERON, A. 2004. Detection and genetic distance of resistant populations of *Pseudosuccinea columella* (Mollusca: Lymnaeidae) to *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea) using RAPD markers. *Acta Tropica*, 92, 83-87.
- CAMPBELL, A. J., SHEERS, M., MOORE, R. J., EDWARDS, S. R. & MONTAGUE, P. E. 1981. Proline biosynthesis by *Fasciola hepatica* at different developmental stages in vivo and in vitro. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 3, 91-101.
- CANETE, R., YONG, M., SANCHEZ, J., WONGII, L. & GUTIÉRREZ, A. 2004. Population dynamics of intermediate snail hosts of *Fasciola hepatica* and some environmental factors in San Juan y Martinez municipality, Cuba. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99, 257-262.
- CARDOSO, P. C. M., CALDEIRA, R. L., LOVATO, M. B., COELHO, P. M. Z., BERNE, M. E. A., MÜLLER, G. & CARVALHO, O. D. S. 2006. Genetic variability of Brazilian populations of *Lymnaea columella* (Gastropoda: Lymnaeidae), an intermediate host of *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea). *Acta Tropica*, 97, 339-345.
- CARVALHO, O. S., CARDOSO, P. C. M., LIRA, P. M., RUMI, A., ROCHE, A., BERNE, E., MÜLLER, G. & CALDEIRA, R. L. 2004. The use of the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism technique associated with the classical morphology for characterization of *Lymnaea columella*, *L. viatrix*, and *L. diaphana* (Mollusca: Lymnaeidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 99, 503-507.

- CARVALHO, O. S., CARVALHO, R. L., SIMPSON, A. J. G. & VIDIGAL, T. H. D. A. 2001. Genetic variability and molecular identification of Brazilian *Biomphalaria* species (Mollusca: Planorbidae). *Parasitology*, 123, 197-209.
- CHEN, Y. C., EISNER, J. D., KATTAR, M. M., RASSOULIAN-BARRETT, S. L., LAFF, K., YARFITZ, S. L., LIMAYE, A. P. & COOKSON, B. T. 2000. Identification of Medically Important Yeasts Using PCR-Based Detection of DNA Sequence Polymorphisms in the Internal Transcribed Spacer 2 Region of the rRNA Genes. *Journal of Clinical Microbiol.*, 38, 2302-2310.
- CONCEIÇÃO, M. A. P., DURÃO, R. M. B., COSTA, I. M. H., CASTRO, A., LOUZÃ, A. C. & COSTA, J. C. 2004. Herd-level seroprevalence of fasciolosis in cattle in north central Portugal. *Veterinary Parasitology*, 123, 93-103.
- COOK, G. C. & ZUMLA, A. I. 2003. *Manson's Tropical Diseases*, W.B. SAUNDERS.
- CORREA, A. C., ESCOBAR, J. S., NOYA, O., VELASQUEZ, L. E., GONZALEZ-RAMIREZ, C., HURTREZ-BOUSSES, S. & POINTIER, J. P. 2011. Morphological and molecular characterization of Neotropic Lymnaeidae (Gastropoda: Lymnaeoidea), vectors of fasciolosis. *Infect Genet Evol*, 11, 1978-88.
- CORREA, A., ESCOBAR, J., DURAND, P., RENAUD, F., DAVID, P., JARNE, P., POINTIER, J.-P. & HURTREZ-BOUSSES, S. 2010. Bridging gaps in the molecular phylogeny of the Lymnaeidae (Gastropoda: Pulmonata), vectors of Fascioliasis. *BMC Evolutionary Biology*, 10, 381.
- CRUZ FERREIRA, F. S. & FREIRE DE OLIVEIRA, C. 1960. A propósito dum novo caso de fasciolíase. *Separata dos Anais do Instituto de Hygiene e Medicina Tropical*, 17, 51-81.
- CURTALE, F., HASSANEIN, Y. A., WAKEEL, A. E., MAS-COMA, S. & MONTESOR, A. 2003. Distribution of Human Fascioliasis by Age and Gender among Rural Population in the Nile Delta, Egypt. *Journal of Tropical Pediatrics*, 49, 264-268.
- DALTON, J. P. 1999. Fasciolosis. CAB International, Wallingford, UK.
- DE SOUZA, C. P., MAHALHÃES, K. G., PASSOS, L. K. J., SANTOS, G. C. P. S., RIBEIRO, F. & KATZ, N. 2002. Aspects of the Maintenance of the Life Cycle

- of *Fasciola hepatica* in *Lymnaea columella* in Minas Gerais, Brazil. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 97, 407-410.
- ESTEBAN, J. G., BARGUES, M. D. & MAS-COMA, S. 1998. Geographical distribution, diagnosis and treatment of human fascioliasis: a review. *Research and Reviews in Parasitology*, 58, 13-42.
- ESTEBAN, J.-G., FLORES, A., AGUIRRE, C., STRAUSS, W., ANGLES, R. & MAS-COMA, S. 1997. Presence of very high prevalence and intensity of infection with *Fasciola hepatica* among Aymara children from the Northern Bolivian Altiplano. *Acta Tropica*, 66, 1-14.
- ESTEBAN, J.-G., FLORES, A., ANGLES, R. & MAS-COMA, S. 1999. High endemicity of human fascioliasis between Lake Titicaca and La Paz valley, Bolivia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 93, 151-156.
- EUZEBY, J. 1970. Écologie et biologie de *Limnea truncatula* en Europe. *Cahiers de Medicine veterinaire*, 40, 283-289.
- EUZEBY, J. 1970. Écologie et biologie de *Limnea truncatula* en Europe. *Cahiers de Medicine veterinaire*, 40, 283-289.
- FERNANDEZ, M. A., THIENGO, S. C. & BOAVENTURA, M. F. 2001. Gastrópodes límnicos do Campus de Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 34, 279-282.
- FERREIRA, V., GRAÇA, M. A. S., FEIO, M. J. & MIEIRO, C. 2004. Water quality in the Mondego river basin: pollution and habitat heterogeneity. *Limnetica* 23, 295-306.
- FOLMER, O., BLACK, M., HOEH, W., LUTZ, R. & VRIJENHOEK, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marin Biology and biotechnology*, 3, 294-299.
- FONSECA, F. D. & AZEVEDO, J. F. D. 1948. Un cas humain de fascioliose hépatique. *Ann. de Parasitologie*, 23, 18-22
- FONSECA, F., FRAGA DE AZEVEDO, J. & MARQUES DA GAMA, M. 1956. Nouveaux cas humains de Fasciolose hépatique au Portugal. *Annals de Parasitologie*, 31, 14-22.

- FONSECA, J. M. C. F. D. & ALMEIDA, V. C. T. D. 1988. A fasciolose na região autónoma da Madeira - contribuição ao seu estudo.
- FONSECA, J. M. D., BASTOS, J. G. & ALMEIDA, V. C. T. D. 1991. Saúde animal na Região Autónoma da Madeira - Implicações económicas e em Saúde Pública. http://www.vetbiblios.pt/ARTIGOS_TECNICOS/Saude_Animal/Saude_Animal_na_RAM_Implicacoes_Economicas_e_em_Saude_Publica.pdf.
- FRANÇA, J. A. P. D. & ALMEIDA, A. B. D. 2003. Plano Regional de Água da Madeira: Síntese do Diagnóstico e dos Objectivos. 6º SILUSBA – Simpósio de Hidráulica e Recursos Hídricos dos Países de Língua Oficial Portuguesa.
- FRANÇA, J. A. P. D. & ALMEIDA, A. B. D. 2003. Plano Regional de Água da Madeira: Síntese do Diagnóstico e dos Objectivos. 6º SILUSBA – Simpósio de Hidráulica e Recursos Hídricos dos Países de Língua Oficial Portuguesa.
- FUENTES, M. V., VALERO, M. A., BARGUES, M. D., ESTEBAN, J. G., ANGLES, R. & MAS-COMA, S. 1999. Analysis of climatic data and forecast indices for human fascioliasis at very high altitude. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 93, 835-850.
- GIOVANELLI, A., VIEIRA, M. V. & SILVA, C. L. P. A. C. D. 2002. Interaction between the Intermediate Host of Schistosomiasis in Brazil *Biomphalaria glabrata* (Planorbidae) and a Possible Competitor *Melanoides tuberculata* (Thiaridae): I. Laboratory Experiments. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97, 363-369.
- GLOER, P. & SÎRBU, I. 2005. New freshwater molluscs species found in the Romanian fauna. *Heldia*, 6 229-238.
- GOUMGHAR, M. D., VIGNOLES, P., RONDELAUD, D., DREYFYSS, G. & BENLEMLIH, M. 2004. Relations entre l'anphibiose de *Galba truncatula* (Mollusca Gastropoda: Lymnaeidae), l'altitude et la nature de ses habitats dans le centre du Maroc. *Revue Médicale Vétérinaire*, 155, 97-103.
- GRÁCIO, M. A. 1981. A importância da malacologia em parasitologia médica, com breve nota sobre os Gastropoda de água doce em Portugal. *Jornal da Sociedade das Ciências Médicas de Lisboa*, 145, 22.

- GRÁCIO, M. A. A. 1983. Distribution and habitats of six species of freshwater pulmonate snails in Algarve, southern Portugal. *Malacological review*, 16, 17-23.
- GRÁCIO, M. A. A. 1985. Contribucion al conocimiento de los moluscos gastropoda de las aguas dulces de Portugal. Distribucion y bio-ecologia de *Lymnaea truncatula* en algunos distritos. *Rev. Iber. Parasitol.*, 45, 9-14.
- GRÁCIO, M. A. A. 1992. *Lymnaea (Fossaria) truncatula*, the intermediate host of *Fasciola hepatica* in Portugal: some aspects of its biology. *Journal Medical & Applied Malacology*, 4, 125-128.
- GRÁCIO, M.A.A. 1994/95 [1999]. Fasciolose humana em Cabo Verde: casos diagnosticados no IHMT/Lisboa/Portugal: Acta Parasitológica Portuguesa, 2, 87-88.
- GUERRANT, R. L., WALKER, D. H. & WELLER, P. F. 2011. *TROPICAL INFECTIOUS DISEASES, Principles, Pathogens & Practice*. ED. , Elsevier, Saunders.
- HALL, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.*, 41, 95-98.
- HAMMAMI, H. & AYADI, A. 1999. Écologie de *Lymnaea truncatula* Muller, hôte intermédiaire de *Fasciola hepatica* Linné dans le microclimat de Tozeur (sud-ouest de la Tunisie). *Parasitologie*, 2047.
- HARRIS, R. E. & CHARLESTON, W. A. G. 1977a. An examination of the marsh microhabitats of *Lymnaea tomentosa* and *L. columella* (Mollusca: Gastropoda) by path analysis. *New Zealand Journal of Zoology*, 4, 395-399.
- HARRIS, R. E. & CHARLESTON, W. A. G. 1977b. Some temperature responses of *Lymnaea tomentosa* and *L. columella* (Mollusca: Gastropoda) and their eggs. *New Zealand Journal of Zoology*, 4, 45-49.
- HASEEB, A., EL-SHAZLY, A., ARAFA, M. & MORSY, A. 2002 A review on fascioliasis in Egypt. *J Egypt Soc Parasitol.* , 32, 317-54.
- HASEGAWA, M., KISHINO, H. & YANO, T. 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J Mol Evol.* , 22, 160-174.

- HEPPLESTON, P. B. 1972. Life history and population fluctuations of *Lymnaea truncatula* (Muller), the snail vector of Fascioliasis. *The Journal of Applied Ecology*, 9, 235-248.
- HUBENDICK, B. 1951. *Recent Lymnaeidae: their variation, morphology, taxonomy, nomenclature and distribution*, Kungl. Svenska Vetenskapsakademiens Handigar.
- JABBOUR-ZAHAB, R., POINTIER, J. P., JOURDANE, J., JARNE, P., OVIEDO, J. A., BARGUES, M. D., MAS-COMA, S., ANGLÉS, R., PERERA, G., BALZAN, C., KHALLAYOUNE, K. & RENAUD, F. 1997. Phylogeography and genetic divergence of some lymnaeid snails, intermediate hosts of human and animal fascioliasis with special reference to lymnaeids from the Bolivian Altiplano. *Acta Tropica*, 64, 191-203.
- JUKES, T. H. & CANTOR, C. R. 1969. Evolution of protein molecules. In: HN, I. M. (ed.) *Mammalian Protein Metabolism*. Academic Press, New York.
- KANE, R. A. & ROLLINSON, D. 1994. Repetitive sequences in the ribosomal DNA internal transcribed spacer of *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma intercalatum* and *Schistosoma mattheei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 63, 153-156.
- KARIMI, G. R., DERA KHSHANFAR, M. & PAYKARI, H. 2004. Population Density, Trematodal Infection and Ecology of *Lymnaea* Snails in Shadegan, Iran. *Arch. Razi Ins.*, 58, 125-129.
- KATOH, K., MISAWA, K., KUMA, K. I. & MIYATA, T. 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*, 30, 3059-3066.
- KENDALL, S. B. 1954. Fascioliasis in Paquistan. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 48, 307-313.
- KENDALL, S. B. 1970. Relationships between the species of *Fasciola* and their Molluscan hosts. *Advances in Parasitology*, 8, 252-258.
- KIJASHKO, P. 2009 *Check-list for Caspian Sea molluscs*. [Online]. http://www.zin.ru/projects/caspsdiv/caspian_molluscs.html. . [Accessed 7 Agosto 2012].

- KIMURA, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. . *Journal of Molecular Evolution* 16, 16, 111-120.
- LIBRADO, P. & ROZAS, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25, 1451-1452.
- LOGAN, F. J., HORÁK, A., ŠTEFKA, J., AYDOGDU, A. & SCHOLZ, T. 2004. The phylogeny of diphyllbothriid tapeworms (Cestoda: Pseudophyllidea) based on ITS-2 rDNA sequences. *Parasitology Research*, 94, 10-15.
- MADEIRA, G. R. 2012. *REGIÃO AUTÓNOMA DA MADEIRA* [Online]. Available: <http://www.gov-madeira.pt/madeira/conteudo/displayconteudo.do2?numero=263>.
- MAGALHÃES, M. K., PASSOS, L. K. J. & CARVALHO, O. S. 2004. Detection of *Lymnaea columella* infection by *Fasciola hepatica* through Multiplex-PCR. . *Memorias Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 99, 421-424.
- MAIA, M. J. 2001. Helmintofauna do veado (*Cervus elaphus* L.) e do gamo (*Dama dama* L.) na Tapada Nacional de Mafra. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 96, 81-84.
- MALEK, E. A. & CHENG, T. C. 1974. *Medical and economical Malacology*, Academic Press, Inc. (London) LTD.
- MANDAHL-BARTH, G. 1962. Key to the identification of East and Central African freshwater snails of medical and veterinary importance. *Bull World Health Organ.* , 27, 135-150.
- MANGA-GONZALEZ, Y., GONZALEZ-LANZA, C. & OTERO-MERINO, B. 1991. Natural infection of *Lymnaea truncatula* by the liver fluke *Fasciola hepatica* in the Porma Basin, León, NW Spain. *Journal of Helminthology*, 65, 15-27.
- MAROCO, J. 2003. *Análise Estatística com Utilização do SPSS*, Edições Silabo, LDA.
- MARXEN, J. C. & BECKER, W. 2000. Calcium binding constituents of the organic shell matrix from the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 127, 235-242.
- MAS-COMA, S. & BARGUES, M. D. 1997. Human Liver Flukes: A Review. *Research and Reviews in Parasitology*, 57, 145-218.

- MAS-COMA, S. 2004. Human Fascioliasis: Epidemiological Patterns in Human Endemic Areas of South America, Africa and Asia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, Vol 35
- MAS-COMA, S., BARGUES, M. D. & VALERO, M. A. 2005. Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *International Journal of Parasitology*, 35, 1255-1278.
- MAS-COMA, S., ESTEBAN, J. G. & BARGUES, M. D. 1999. Epidemiology of human fascioliasis: a review and proposed new classification. *Bulletin of the World Health Organ*, 77, 340-346.
- MAS-COMA, S., FUNATSU, I. R. & BARGUES, M. D. 2001. *Fasciola hepatica* and lymnaeid snails occurring at very high altitude in South America. *Parasitology*, 123, S115-S127.
- MAS-COMA, S., RODRIGUEZ, A., BARGUES, M. D., VALERO, M. A., COELLO, J. R. & ANGLES, R. 1997. Secondary reservoir role of domestic animals other than sheep and cattle in fascioliasis transmission in the Northern Bolivian Altiplano. *Research and reviews in Parasitology*, 57, 39-46.
- MAS-COMA, S., VALERO, M. A. & BARGUES, M. D. 2008. Effects of climate change on animal and zoonotic helminthiases. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz*, 27, 443-452.
- MAS-COMA, S., VALERO, M. A. & BARGUES, M. D. 2009. Chapter 2 *Fasciola*, Lymnaeids and Human Fascioliasis, with a Global Overview on Disease Transmission, Epidemiology, Evolutionary Genetics, Molecular Epidemiology and Control. In: ROLLINSON, D. & HAY, S. I. (eds.) *Advances in Parasitology*. Academic Press.
- MAS-COMA, S., VALERO, M. A. & BARGUES, M. D. 2009. Climate change effects on trematodiasis, with emphasis on zoonotic fascioliasis and schistosomiasis. *Veterinary Parasitology*, 163, 264-280.
- MCKOWN, R. D. & RIDLEY, R. K. 1995. Distribution of fasciolosis in Kansas, with results of experimental snail susceptibility studies. *Veterinary Parasitology*, 56, 281-291.

- MENDONÇA, M. M. & BARATA, M. C. S. 1992. Alguns dados epidemiológicos relativos à fasciolose em S. Miguel (Açores). *Garcia de Orta, Sér. Zooll., Lisboa*, 16, 31-40.
- MENDONÇA, M. M. 1992a. Contribuição para o conhecimento de algumas características dos biótopos de *Lymnaea truncatula* Müller, 1774 em S. Miguel (Açores). . *Garcia de Orta, Sér. Zooll., Lisboa*, 16, 77/89.
- MENDONÇA, M. M. 1992a. Contribuição para o conhecimento de algumas características dos biótopos de *Lymnaea truncatula* Müller, 1774 em S. Miguel (Açores). . *Garcia de Orta, Sér. Zooll., Lisboa*, 16, 77/89.
- MENDONÇA, M. M. 1992b. A distribuição geográfica de *Lymnaea truncatula* Müller, 1774 em S. Miguel (Açores). *Garcia de Orta, Sér. Zooll., Lisboa*, 16, 65-76.
- MOENS 1981. Les habitats de *Lymnaea truncatula*, hôte intermédiaire de *Fasciola hepatica*. *Revue de l'agriculture*, 34, 1563-1578.
- MORGAN, J. A. T., DEJONG, R. J., JUNG, Y., KHALLAAYOUNE, K., S.KOCK, MKOJI, G. M. & LOKERA, E. S. 2002. A phylogeny of planorbid snails, with implications for the evolution of *Schistosoma* parasites. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 25 477–488.
- MORGAN-RYAN, U. M., A.FALL, WARD, L. A., HIJAWI, N., SULAIMAN, I., FAYER, R., THOMPSON, R. C. A., OLSON, M., LAL, A. & XIAU, L. 2002. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 49, 433-440.
- MORLEY, N. J. 2010 Interactive effects of infectious diseases and pollution in aquatic molluscs. *Aquatic Toxicology* 96, 27-36.
- MSBRASIL 2007. Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica. *Série A. Normas e Manuais Técnicos*. 2nd ed.
- OLIVEIRA, A. L., DA SILVA, D., MANZANO, B. C., ABDEL-HAMID, A. Z., MARCELINO, M. Y., ZANOTTI-MAGALHÃES, E. M., MAGALHÃES, L. A. & RIBEIRO-PAES, J. T. 2010. Genetic differences between strains of *Biomphalaria glabrata* (Planorbidae) that are susceptible and unsuceptible to schistosomiasis. *Genet Mol Res.*, 9, 1450-1459.
- OLLERENSHAW, C. B. & SMITH, L. P. 1969. Meteorological factors and forecast of helminthic disease. *Advances in Parasitology*, 7, 283-323.

- PARAENSE, W. L. 1983. *Lymnaea columella* in northern Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 78, 477-482.
- PIP, E. & FRANCK, J. P. C. 2008. Molecular phylogenetics of central Canadian Physidae (Pulmonata: Basommatophora). *Canadian Journal of Zoology*, 86, 10-16.
- POINTIER, J.-P., COUSTAU, C., RONDELAUD, D. & THERON, A. 2007. *Pseudosuccinea columella* (Say 1817) (Gastropoda, Lymnaeidae), snail host of *Fasciola hepatica* : first record for France in the wild. *Parasitology Research*, 101, 1389-1392.
- POSADA, D. 2002. Using MODELTEST and PAUP* to Select a Model of Nucleotide Substitution. In: BAXEVANIS, A. D., DAVISON, D. B., PAGE, R. D. M., PETSKO, G. A., STEIN, L. D. & STORMO, G. D. (eds.) *Current Protocols in Bioinformatics*. John Wiley & Sons, Inc.
- POSADA, D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25, 1253-1256.
- PRASAD, P. K., GOSWAMI, L. M. & CHATTERJEE, V. T. A. 2011. PCR-based molecular characterization and insilico analysis of food-borne trematode parasites *Paragonimus westermani*, *Fasciolopsis buski* and *Fasciola gigantica* from northeast India using ITS2 rDNA. *Bioinformation*, Volume 6, 64-68.
- PREPELITCHI, L., KLEIMAN, F., PIETROKOVSKY, S. M., MORIENA, R. A., RACIOPPI, O., ALVAREZ, J. & WISNIVESKY-COLLI, C. 2003. First Report of *Lymnaea columella* Say, 1817 (Pulmonata: Lymnaeidae) Naturally Infected with *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) (Trematoda: Digenea) in Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 889-891, 889-891.
- PREPELITCHI, L., PIETROKOVSKY, S., KLEIMAN, F., RUBEL, D., ISSIA, L., MORIENA, R., RACIOPPI, O., ALVAREZ, J. & WISNIVESKY-COLLI, C. 2011. Population Structure and Dynamics of *Lymnaea columella* (Say, 1817) (Gastropoda: Lymnaeidae) in Wetlands of Northeastern Argentina. *Zoological Studies*, 50, 164-176.
- RAAHAUGE, P. & KRISTENSEN, T. K. 2000. A comparison of *Bulinus africanus* group species (Planorbidae; Gastropoda) by use of the internal transcribed

- spacer 1 region combined by morphological and anatomical characters. *Acta Tropica*, 75, 85-94.
- RADEV, V., HRUSANOY, D. & TSOICHEVA-GAUTANDZHIEVA, N. 2004. Cercarial fauna and seasonal diffusion of *Lymnaea truncatula* (Muller, 1774). *Experimental pathology and parasitology*, 7, 85-90
- REMIGIO, E. A. & BLAIR, D. 1997. Molecular systematics of the freshwater snail family Lymnaeidae (Pulmonata: Basommatophora) utilising mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Journal of Molluscan Studies*, 63, 173-185.
- RILEY, L. A., DYBDAHL, M. F. & HALL, R. O. 2008. Invasive species impact: asymmetric interactions between invasive and endemic freshwater snails. *J. N. Am. Benthol. Soc.*, 27, 509-520.
- ROBERTS, E. W. 1950. Studies on the life-cycle of *Fasciola hepatica* (Linnaeus) and of its snail host, *Lymnaea (Galba) truncatula* (Muller), in the field and under controlled conditions in the laboratory. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 44, 187-206.
- ROLLINSON, D., STOTHARD, J. R., JONES, C. S., LOCKYER, A. E., DE SOUZA, C. P. & NOBLE, L. R. 1998. Molecular characterisation of intermediate snail hosts and the search for resistance genes. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, 93, 111-116.
- ROMBERT, P. C. & GRÁCIO, M. A. A. 1984. Fasciolíase hepática humana: sua distribuição em Portugal. *O Médico*, 110, 77-83.
- ROMBERT, P. C., GRÁCIO, M. A. A. & TRINCA, A. 1991. Importância crescente da fasciolíase hepática humana em Portugal. *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas*, 14, 243-250.
- RONQUIST, F. & HUELSENBECK, J. P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19, 1572-1574.
- SABA, R., KORKMAZ, M., INAN, I., MAMIKO LU, L., TURHAN, Ö., GÜNSEREN, F., ÇEVIKOL, C. & KABAALIO LU, A. 2004. Human fascioliasis. *Clinical Microbiology and Infection*, 10, 385-387.
- SAMADI, S., ROUMEGOUX, A., BARGUES, M. D., MAS-COMA, S., YONG, M. & POINTIER, J. P. 2000. Morphological studies of lymnaeid snails from the

- human fascioliasis endemic zone of Bolivia. *Journal of Molluscan Studies*, 66, 31-44.
- SAMPAIO-SILVA, M. L., CAPRON, A. & CAPRON, M. 1980. Human fascioliasis in Portugal. *Arquivos do Instituto Nacional de Saúde*, 4, 101-109.
- SANTOS, F. D. & MIRANDA, P. 2006. *Alterações climáticas em Portugal: cenários, impactos e medidas de adaptação - Projecto SIAM II*.
- SOLIMAN, M. 2008. Epidemiological review of human and animal fascioliasis in Egypt. . *The Journal of Infection in Developing Countries, North America.*, 2, 182-189.
- SPADA, R. G. M., DA SILVA, D., ABDEL-HAMID, A.-Z., SOBRAL-HAMAGUCHI, S. S., ZUIM, N. R. B., ZANOTTI-MAGALHÃES, E. M., MAGALHÃES, L. A. & RIBEIRO-PAES, J. T. 2002. Genetic markers between *Biomphalaria glabrata* snails susceptible and resistant to *Schistosoma mansoni* infection. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 97, 53-58.
- SPIRIDONOV, S. E., REID, A. P., PODRUCKA, K., SUBBOTIN, S. A. & MOENS, M. 2004. Phylogenetic relationships within the genus *Steinernema* (Nematoda: Rhabditida) as inferred from analyses of sequences of the ITS1-5.8S-ITS2 region of rDNA and morphological features. *Nematology*, 6, 547-566.
- STOTHARD, J. R. & ROLLINSON, D. 1996. An evaluation of random amplified polymorphic DNA (RAPD) for the identification and Phylogeny of freshwater snails of the genus *Bulinus* (Gastropoda: Planorbidae). *J. Moll. Stud.*, 62, 165-176.
- STOTHARD, J. R., BRÉÂMOND, P., ANDRIAMARO, L., LOXTON, N. J., SELLIN, B., SELLIN, E. & ROLLINSON, D. 2000. Molecular characterization of the freshwater snail *Lymnaea natalensis* (Gastropoda: Lymnaeidae) on Madagascar with an observation of an unusual polymorphism in ribosomal small subunit genes. *J. Zool., Lond.* , 252, 303-315.
- STOTHARD, J. R., HUGHES, S. & ROLLINSON, D. 1996. Variation within the Internal Transcribed Spacer (ITS) of ribosomal DNA genes of intermediate snail hosts within the genus *Bulinus* (Gastropoda: Planorbidae). *Acta Tropica*, 61, 19-29.

- STOTHARD, J. R., MGENI, A. F., ALAWI, K. S., SAVIOLI, L. & ROLLINSON, D. 1997. Observations on shell morphology, enzymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) in *Bulinus africanus* group snails (Gastropoda: Planorbidae) in Zanzibar. *Journal of molluscan studies*, 63, 489-503.
- TAMURA, K. & NEI, M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10, 512-526.
- TAMURA, K. 1992. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases. *Molecular Biology and Evolution*, 9, 678-687.
- TAMURA, K., PETERSON, D., PETERSON, N., STECHER, G., NEI, M. & KUMAR, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28, 2731-2739.
- TOSTES, R., SANTARÉM, V., ALBERTI, H. & SANCHES, A. 2004. Casos autóctones de *Fasciola hepatica* na região de Presidente Prudente, São Paulo, Brazil *Ciência Rural, Santa Maria*, 34, 961-962.
- UETA, M. T. 1976. Alguns aspectos da biologia de *Lymnaea columella* Say, 1817 (Gastropoda, Pulmonata). *Revista de Saúde Pública*, 10, 355-366.
- UTUK, A. E., SIMSEK, S., KOROGLU, E. & MCMANUS, D. P. 2008. Molecular genetic characterization of different isolates of *Echinococcus granulosus* in east and southeast regions of Turkey. *Acta Tropica*, 107, 192-194.
- VALENTE, M. F. & VICENTE-PICCIOCHI, M. M. J. 1979. Gasterópodes de água doce de Portugal: 1. Nota sobre duas espécies da família Limnaeidae. *Bolm. Soc. port. Ciênc. nat.*, 19.
- VALERO, M. A., MARCOS, M. D., FONS, R. & MAS-COMA, S. 1998. *Fasciola hepatica* development in the experimentally infected black rat *Rattus rattus*. *Parasitol Res.*, 84, 188-194.
- VALERO, M. A., SANTANA, M., MORALES, M., HERNANDEZ, J. L. & MAS-COMA, S. 2003. Risk of Gallstone Disease in Advanced Chronic Phase of Fascioliasis: An Experimental Study in a Rat Model. *The Journal of Infectious Diseases*, 188, 787-793.

- VAN BORTEL, W., SOCHANTA, T., HARBACH, R. E., SOCHEAT, D., ROELANTS, P., BACKELJAU, T. & COOSEMANS, M. 2002. Presence of *Anopheles culicifacies* B in Cambodia established by the PCR-RFLP assay developed for the identification of *Anopheles minimus* species A and C and four related species. *Medical and Veterinary Entomology*, 16, 329-334.
- VARGAS, D., VEGA, M. & GONZÁLEZ, C. G. 2003. Aproximación a una caracterización molecular de *Fasciola hepatica* por la técnica RAPDs - PCR. *Parasitología latinoamericana*, 58, 11-16.
- VASILEVA, I. N. 1960. Ammonium nitrate for the control of *Galba truncatula* on pasture. *Veterinariya*, 37, 41-43.
- VIDIGAL, T. H. D. A., CALDEIRA, R. L., J.G., A., SIMPSON, A. J. G. & CARVALHO, O. S. 2000. Further Studies on the Molecular Systematics of *Biomphalaria* Snails from Brazil. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 95, 57-66.
- VIDIGAL, T. H., KISSINGER, J. C., CALDEIRA, R. L., PIRES, E. C., MONTEIRO, E., SIMPSON, A. J. & CARVALHO, O. S. 2000. Phylogenetic relationships among Brazilian *Biomphalaria* species (Mollusca: Planorbidae) based upon analysis of ribosomal ITS2 sequences. *Parasitology*, 121, 611-620.
- VIGNOLES, P., G. DREYFUSS, G. & RONDELAUD, D. 2002. Redial growth and cercarial productivity of *Fasciola hepatica* in three species of young lymnaeid snails. *Journal of Helminthology*, 76, 269-272.
- WANG, G., WHITTAM, T. S., BERG, C. M. & BERG, D. E. 1993. RAPD (arbitrary primer) PCR is more sensitive than multilocus enzyme electrophoresis for distinguishing related bacterial strains. *Nucleic Acids Research*, 21, 5930-5933.
- WHEELER, W. C. & HONEYCUTT, R. L. 1988. Paired sequence difference in ribosomal RNAs: evolutionary and phylogenetic implications. *Molecular Biology and Evolution*, 5, 90-96.
- WHO 1995. Control of the foodborne trematode infections. *WHO technical report series*.
- WHO 2007. Report of the WHO Informal Meeting on use of triclabendazole in fascioliasis control. *WHO techical report series WHO/CDS/NTD/PCT/2007.1*

- WILKERSON, R. C., REINERT, J. F. & LI, C. 2004. Ribosomal DNA ITS2 Sequences Differentiate Six Species in the *Anopheles crucians* Complex (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.*, 41, 39-42.
- WILLIAMS, J. G. K., KUBELIK, A. R., LIVAK, K. J., RAFALSKI, J. A. & TINGEY, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18, 6531-6535.
- WRIGHT, P. S. & SWIRE, P. W. 1984. Soil type and the distribution of *Lymnaea truncatula*. *The Veterinary Record*, 114, 294-295.
- WULLSCHLEGER, E. B. & WARD, P. I. 1998. Shell form and habitat choice in *Lymnaea*. *Journal of Molluscan Studies*, 64, 402-404.
- XAVIER, M. D. L., AZEVEDO, J. F. D. & CRUZ, A. A. D. 1965. A *Lymnaea truncatula* vectora em Portugal da *Fasciola hepatica*. *Rev. Iber. Parasitol.*, 25, 357-370.
- YI, Z., CLAMP, J., AL-RASHEID, K. A. S., AL-KHEDHAIRY, A. A., CHEN, Z. & SONG, W. 2009. Evolutionary relationship and species separation of four morphologically similar stichotrichous ciliates (Protozoa, Ciliophora). *Progress in Natural Science*, 19, 581-586.

Anexos



Anexo 1

Moluscos de Água Doce – Ficha de Campo

Observação nº _____	Data ____/____/____	Hora ____ : ____
---------------------	---------------------	------------------

Localização do criadouro _____		
Localidade mais próxima _____	Concelho _____	Distrito _____
Altitude _____	Latitude _____	Longitude _____

Formação e Manutenção do criadouro _____					
Rio <input type="checkbox"/>	Ribeiro <input type="checkbox"/>	Pequeno caudal de água <input type="checkbox"/>	Lago <input type="checkbox"/>	Lagoa <input type="checkbox"/>	
Canal de Irrigação <input type="checkbox"/>	Charco <input type="checkbox"/>	Poça <input type="checkbox"/>	_____	<input type="checkbox"/>	

Carácter do criadouro _____		
Permanente <input type="checkbox"/>	Temporário <input type="checkbox"/>	Área de superfície da colecção de água _____

Ecologia e Biologia do criadouro _____					
Vegetação na colecção de água: Emergente <input type="checkbox"/> Flutuante <input type="checkbox"/> Imersa <input type="checkbox"/> Nula <input type="checkbox"/>					
Vegetação na margem, projectada sobre o criadouro: muita <input type="checkbox"/> pouca <input type="checkbox"/> nenhuma <input type="checkbox"/>					
Quantidade de vegetação aquática: Leve <input type="checkbox"/> Densa <input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/>					
Tipo de vegetação na água: _____					
Tipo de vegetação na margem do criadouro: _____					
Exposição solar: Total <input type="checkbox"/> Fraca <input type="checkbox"/> Escassa <input type="checkbox"/> Mínima <input type="checkbox"/> Nula <input type="checkbox"/>					

Substrato _____					
Rochas <input type="checkbox"/>	Areia <input type="checkbox"/>	Argila <input type="checkbox"/>	Humus <input type="checkbox"/>	Matéria em decomposição <input type="checkbox"/>	

Contacto com o Homem

Distância à habitação _____ Uso da colecção de água pela pop. local: Sim ☐ Não ☐

Outras características do criadouro

Aves aquáticas: Sim ☐ Não ☐

Mamíferos: Sim ☐ Não ☐

Características físico-químicas da água do criadouro

Cor: Incolor ☐ Escura ☐

Cheiro: Inodora ☐ Fétida ☐

Limpidez: Límpida ☐ Turva ☐

Dureza Total: _____ Dureza (CaCO₃): _____

Profundidade: <50 cm ☐ >50cm ☐

Temperatura da água (à superfície): _____ pH _____ Condutividade _____

Oxigenação: _____mg/L

Laboratório

Espécies colectadas	Jovens	Adultos	Total

Densidade dos moluscos

Pequena	<input type="checkbox"/>	Média	<input type="checkbox"/>	Nula	<input type="checkbox"/>
---------	--------------------------	-------	--------------------------	------	--------------------------

Infecção

Não	<input type="checkbox"/>	Sim	<input type="checkbox"/>
-----	--------------------------	-----	--------------------------

Cercárias

Não	<input type="checkbox"/>	Sim	<input type="checkbox"/>
-----	--------------------------	-----	--------------------------

Observações.

Anexo 2

PURIFICAÇÃO DE PRODUTO DE PCR: (QIAGEN – QIAquick PCR purification kit protocol)

Notas:

- Adicionar etanol (96 – 100%) ao tampão PE ao abrir o kit e marcar no frasco que o etanol foi adicionado (verificar volume no frasco).
- Todas as centrifugações são a $\geq 10.000g$ (aproximadamente 13.000rpm) numa microcentrífuga convencional de bancada.

- 1) Adicionar 5 volumes de tampão PB à 1 volume da reação de PCR e misturar. Não é necessário remover o óleo mineral ou querosene.

Por exemplo, adicionar 500 μ L de tampão PB a 100 μ L de reação de PCR.

- 2) Colocar uma coluna QIAquick no tubo coletor de 2mL fornecido no kit.
- 3) Aplicar a amostra na coluna QIAquick para ligar o DNA e centrifugar por 30-60 segundos.
- 4) Descartar o líquido do tubo coletor. Recolocar a coluna no mesmo tubo.
- 5) Acrescentar 0,75mL de tampão PE na coluna QIAquick para lavar e centrifugar por 30-60 segundos.
- 6) Descartar o líquido do tubo coletor e recolocar a coluna no mesmo tubo. Centrifugar a coluna por mais um minuto na velocidade máxima.

IMPORTANTE: O etanol residual do tampão PE não será completamente removido se o líquido do tubo coletor não for removido antes desta centrifugação adicional.

- 7) Colocar a coluna QIAquick num tubo de microcentrífuga de 1,5mL.
- 8) Adicionar 50 μ L do tampão EB (Tris 10mM, pH 8,5) ou água (pH 8,5) no centro da membrana para eluir o DNA e centrifugar por 1 minuto. Alternativamente, para uma maior concentração de DNA, adicionar 30 μ L de tampão EB ao centro da membrana, deixar repousar por 1 minuto e então centrifugar.

IMPORTANTE: Assegure-se de que o tampão EB seja dispensado exatamente no centro da membrana para que o DNA ligado seja completamente eluído. O volume médio do eluato é de 48 μ L para 50 μ L de tampão de eluição e 28 μ L para 30 μ L de EB.

A eficiência da eluição é dependente do pH. A eficiência máxima é obtida em pH 7,0 – 8,5. Ao usar água, certifique-se que o pH esteja nesta faixa, e armazene o DNA a -20°C , já que o DNA pode degradar na ausência de um agente tamponante. O DNA também pode ser eluído em TE (Tris 10mM, EDTA 1mM, pH 8,0), mas o EDTA presente pode inibir reações enzimáticas subsequentes.

Anexo 3 - Sequências nucleotídicas 18S do rDNA

>Am9

AGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTTCACACTGTTTGACGGTGAAACCGCGAATGGCTCATTAAATCAGTCGAGGTT
CCTTAGATGACACGATCCTACTTGGATAACTGTGGCAATTCTAGAGCTAATACATGCTTACCAAGCTCCGACCTTTATTGAAAGAGcgTTTTATT
AGTTCAAAACCAATCGCGTCTTTC-----
GCGAGGGCGGTGTCCCATTTGGTGACTcTGGATAACTTTGTCTGATCGCATGGCCTTCGTGCCGCGACGCATCTTTCAAATGTCTGCCCTATC
AAATGTCGATGGTACGTGATATGCCTACCATGTTTGTAAACGGGTAAACGGGGAATCAGGGTTCGATTCCGAGAGGGAGCATGAGAAACGGcTAC
CACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAACTTACCACTCCCGCACGGGGAGGTAGtGAcGAAAAATAACAATACGGGACTCTTCAGAGCCCC
CGTAaattGGAATGAGTACACTTTAAACCTTTAACGAGGATCTATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGAATTCCAGCTCCAATAGC
GTATATTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCTCGGGTGAGGCGGGCGGTCCGGCTCGCGCCGGTTCAGTCCCGTATTAAAT
CCTGCCCTACTTGTCTGCCGGCTCTCTCCGCGGGTGCTCTTCGCTGAGCGTCCCGGGTGGCGGCGCGTTCATTGAAAAAATTAGAGTGTTC
AAGCAGGCATTCACAAGCTGAATAATGGTGCATGGAATAATGGAATAGGACCTCGGTTCTATTTGTTGGTTTTCGGAACTGGAGGTAATGATT
AACAGGGACAAACGGGGGCATTTCGATTGCGGCGTTAGAGGTGAAATTCCTGGATCGCCGCAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGTCAAGA
ATGTTTTATTAGTCAAGAACGAAAGTCAGAGGCGCGAAGACGATCAGATACCGTCTGATGTTCTGACCATAAACTATGCCACCTGGCCATCCGCA
GGAGTTGCTTCGATGACTCTCGGGGCGGCC-
TCCGGGAAACCAAGGTTTTGGGTTCCGGGGGAAGTATGGTTCGAAAGCTGAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGA
GCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTCACCCGGTCCGGACACTGTAAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTTCTTGATTCGGTGGGT
GGTGGTGATCGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGCGATTTGTCTGGTTAATTCGATAACGAACGAgACTCTAGCCTATTAAATAGTTCCGCTCGGTG
GTTCTATTGCCGACGGCGTACACTTCTAGAGGGACGAGTGCGGTTTAgCCACACGAAATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTC
CGGGGCCGACGCGCGCTACACTGAAGGAATCAGCGTGGATGCCTCCCTGGCCCCGAAAGGGCTGGGAAACCCGTTGAATCTCCTTCGTGCTAG
GGATTGGGGCTTGAATTGTTCCCATGAACGAGGAATCCAGTAGAAGCGCGAGTCATAAGCTCGCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACA
CCGCCCCGCTGCTACTATCGATTGAGCGGTTCAAGTGGGCGCTCGGACTGGTCTCGGTCTGGCGTGCAAGCGCCGGCACCGTTGGCCGGGAAGA
CgCTCGAACTCGATCGCTTG

>Am10

AGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTTCACACTGTTTGACGGTGAAACCGCGAATGGCTCATTAAATCAGTCGAGGTT
CTTAGATGACACGATCCTACTTGGATAACTGTGGCAATTCTAGAGCTAATACATGCTTACCAAGCTCCGACCTTTATTGAAAGAGcgTTTTATTA
GTTCAAACCAATCGCGGCCATTCTTCACTTGCCTGGTGGTGTCCCATTTGGTGACTcTGGATAACTTTGTCTGATCGCATGGCCTTCGTGC
CGGCGACGCATCTTTCAAATGTCTGCCCTATCAAATGTGATGGTACGTGATATGCCTACCATGTTTGTAAACGGGTAACGGGGAATCAGGGTTG
ATTCCGGAGAGGGAGCATGAGAAACGGCTACCATCCAAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCACTTACCACTCCCGGCACGGGGAGGTAGTAC
GAAAAATAACAATACGGGACTCTTCGAGGCCCGTAATTGGAATGAGTACACTTTAAACCTTTAACGAGGATCTATTGGAGGGCAAGTCTGG
TGCCAGCAGCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCTCGGGTGAGGCGGGCGG
TCCGGCTCGCGCCGTTCACTGCCCGTATTAAATCCTGCCCTACTTGTCTGCCGCTCTCTCCCGCGGGTCTCTTCGCTGAGCGTCCCGGGTGGC
CGGCGCGTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTCAAAGCAGGCATTACAAGCTGAATAATGGTGCATGGAATAATGGAATAGGACCTCGGTT
TATTTTGTGGTTTTCGGAACTGGAGGTAAATGATTAAACAGGGACAAACGGGGGCATTCTGATTGCGGCGTTAGAGGTGAAATTTTGGATCGCC
GCAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGTCAAGAATGTTTTATTAGTCAAGAACGAAAGTCAGAGGCGCGAAGACGATCAGATACCGTCTAG
TTCTGACCATAAACTATGCCACCTGGCCATCCGAGGAGTTGCTTCGATGACTCTCGGGGCGGCC-
TCCGGGAAACCAAGGTTTTGGGTTCCGGGGGAAGTATGGTTCGAAAGCTGAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGA
GCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTCACCCGGTCCGGACACTGTAAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTTCTTGATTCGGTGGGT
GGTGGTGATCGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGCGATTTGTCTGGTTAATTCGATAACGAACGAGACTCTAGCCTATTAAATAGTTCCGCTCGGTG
GTTCTATTGCCGACGGCGTACACTTCTAGAGGGACGAGTGCGGTTTAGCCACACGAAATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTC
CGGGGCCGACGCGCGCTACACTGAAGGAATCAGCGTGGATGCCTCCCTGGCCCCGAAAGGGCTGGGAAACCCGTTGAATCTCCTTCGTGCTAG
GGATTGGGGCTTGAATTGTTCCCATGAACGAGGAATCCAGTAGAAGCGCGAGTCATAAGCTCGCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACA
CCGCCCCGCTGCTACTATCGATTGAGCGGTTCAAGTGGGCGCTCGGACTGGTCTCGGTCTGGCGTGCAAGCGCCGGCACCGTTGGCCGGGAAGA
CGCTCGAACTCGATCGCTTG

>Am11

AGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTTCACACTGTTTGACGGTGAAACCGCGAATGGCTCATTAAATCAGTCGAGGTT
CCTTAGATGACACGATCCTACTTGGATAACTGTGGCAATTCTAGAGCTAATACATGCTTACCAAGCTCCGACCTTTATTGAAAGAGCGcTTTTAT
TAGTTCAAAACCAATCGCGGCCATTCTTCACTTGCCTGGTGGTGTCCCATTTGGTGACTcTGGATAACTTTGTCTGATCGCATGGCCTTCGT
GCCGGCAGCATCTTTCAAATGTCTGCCCTATCAAATGTGATGGTACGTGATATGCCTACCATGTTTGTAAACGGGTAACGGGGAATCAGGGTT
CGATTCGGAGAGGGAGCATGAGAAACGGCTACCATCCAAAGGACAGCAGGCGCGCACTTACCACTCCCGGCACGGGGAGGTAGTG
ACGAAAAATAACAATACGGGACTCTTCGAGGCCCGTAATTGGAATGAGTACACTTTAAACCTTTAACGAGGATCTATTGGAGGGCAAGTCT
GGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCTCGGGTGACGCGGGC
GGTCCGGCTCGCGCGGTTCACTGCCCGTATTAAATCCTGCCCTACTTGTCTGCCGCTCTCTCCCGCGGGTCTCTTCGCTGAGCGTCCCGGGTG
GCCGGCGCGTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTCAAAGCAGGCATTACAAGCTGAATAATGGTGCATGGAATAATGGAATAGGACCTCGGT
TCTATTTTGTGGTTTTTCGGAAGTGGAGGTAATGATTAAACAGGGACAAACGGGGCAATTCGATTGCGGCGTTAGAGGTGAAATTTTGGATCG
CCGCAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGTCAAGAATGTTTTATTAGTCAAGAACGAAAGTCAGAGGCGCGAAGACGATCAGATACCGTCTG
AGTTCTGACCATAAACTATGCCACCTGGCCATCCGAGGAGTTGCTTCGATGACTCTCGGGGCGGCC-
TCCGGGAAACCAAGGTTTTGGGTTCCGGGGGAAGTATGGTTCGAAAGCTGAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGA
GCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTCACCCGGTCCGGACACTGTAAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTTCTTGATTCGGTGGGT
GGTGGTGATCGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGCGATTTGTCTGGTTAATTCGATAACGAACGAGACTCTAGCCTATTAAATAGTTCCGCTCGGTG
GTTCTATTGCCGACGGCGTACACTTCTAGAGGGACGAGTGCGGTTTAGCCACACGAAATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTC
CGGGGCCGACGCGCGCTACACTGAAGGAATCAGCGTGGATGCCTCCCTGGCCCCGAAAGGGCTGGGAAACCCGTTGAATCTCCTTCGTGCTAG
GGATTGGGGCTTGAATTGTTCCCATGAACGAGGAATCCAGTAGAAGCGCGAGTCATAAGCTCGCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACA
CCGCCCCGCTGCTACTATCGATTGAGCGGTTCAAGTGGGCGCTCGGACTGGTCTCGGTCTGGCGTGCAAGCGCCGGCACCGTTGGCCGGGAAGA
CGCTCGAACTCGATCGCTTG

Lymnaea truncatula em Portugal: contribuição para o estudo
da bioecologia e da variação genética.

>Am12

AGTCATATGCTTGCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTTCACACTGTTTGACGGTGAAACCGCAATGGCTCATTAAATCAGTCGAGGTT
 CcTTAGATGACACGATCCTACTTGGATAACTGTGGCAATTCTAGAGCTAATACATGCTTACCAAGCTCCGACCTTTATTGGAAAGAGcGcTTTTATT
 AGTTCAAACCAATCGCCGGCCATTCACTTGCCTGGTGGTGTCCCATTTGGTGACTcTGGATAACTTTGTGCTGATCGCATGGCCTTCGTg
 CCGGGCGACGCATCTTTCAAATGTcTGCCCTATCAAATGTcGATGGTACGTGATATGCCCTACCATGTTTGTAAACGGGTAACGGGGAATCAGGGTTC
 GATTCCGGAGAGGGAGCAtGAGAAACGGcTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAACTTACCCACTCCCGGCACGGGGAGGTAGtGAc
 GAAAAATAACAATACGGGACTCTTCGAGGCCCGTAATGGAATGAGTACACTTTAAACCTTTAACGAGGATCTATTGGAGGGCAAGTCTGGT
 GCCAGCAGCCGCGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGACGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCTCGGGTGACAGCGGGCGGT
 CCGGCTCGCGCGGTTCACTGCCGTATTAATCCTGCCCTACTTGTCTGCCGGCTCTCTCCCGGGGTGCTCTTCGCTGAGCGTCCCGGGTGGCC
 GGCGCGTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCATTACAAGCCTGAATAATGGTGATGGAATAATGGAATAGGACCTCGGTTCT
 ATTTTGTGGTTTTCGAACTGGAGGTAATGATTAACAGGGACAACGGGGGCGATTGCTATTGCGGCGTTAGAGGTGAAATTTCTGGATCGCCG
 CAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTGTCAAGAATGTTTTCATTAGTCAAGAACGAAAGTCAAGGCGCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGT
 TCTGACCATAAACTATGCCACCTGGCCATCCGCAGGAGTTGCTTCGATGACTCTGCGGGCGGCC-
 TCCGGGAACCAAGGTTTTGGGTTCGGGGGGAAGTATGTTGCAAAGCTGAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGA
 GCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTCACCCGGTCCGGACACTGTAAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTTCTTGATTGCGTGGGT
 GGTGGTGATGGCGTTCTAGTTGGTGAGCGATTGTCTGGTTAATTCGATAACGAACGAgACTCTAGCCTATTAATAGTTGCGCTCGGTG
 GTTCTATTGCCGACGGCGTACACTCTTAGAGGGACGAGTGGCGTTAgCCACACgAAATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTC
 CGGGGCGCACGCGCGCTACACTGAAGGAATCAGCGTGGATGCCTCCCTGGCCCCGAAAGGGCTGGGAAACCCGTTGAATCTCCTTCGTGCTAG
 GGATTGGGGCTTGAATTTGTTCCCATGAACGAGGAATCCAGTAAGCGCGAGTCATAAGCTCGCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACA
 CCGCCCGTCGCTACTATCGATTGAGCGGTTCAGTGAGGGCCTCGGACTGGTCTCGGTCTGGCGTGCAAGCGCCGGCACCGTTGGCCGGGAAGA
 CgCTCGAACTCgATCGCTTG

>Am13

AGTCATATGCTTGCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTTCACACTGTTTGACGGTGAAACCGCAATGGCTCATTAAATCAGTCGAGGTT
 CCTTAGATGACACGATCCTACTTGGATAACTGTGGCAATTCTAGAGCTAATACATGCTTACCAAGCTCCGACCTTTATTGGAAAGAGCGCTTTTAT
 TAGTTCAAACCAATCGCCGGCCATTCACTTGCCTGGTGGTGTCCCATTTGGTGACTcTGGATAACTTTGTGCTGATCGCATGGCCTTCGT
 GCCGGCGACGCATCTTTCAAATGTCTGCCCTATCAAATGTGATGGTACGTGATATGCCCTACCATGTTTGTAAACGGGTAACGGGGAATCAGGGTT
 CGATTCCGGAGAGGGAGCATGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAACTTACCCACTCCCGGCACGGGGAGGTAGTG
 ACGAAAAATAACAATACGGGACTCTTCGAGGCCCGTAATTTGGAATGAGTACACTTTAAACCTTTAACGAGGATCTATTGGAGGGCAAGTCT
 GGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAAGTTAAAAAGCTCgTAGTtGGATCtCgGGTGACAGCGGGCG
 GTCCGGCTCGCGCGGTTCACTGCCGTATTAATCCTGCCCTACTTGTCTGCCGGCTCTCTCCCGGGGTGCTCTTCGCTGAGCGTCCCGGGTGG
 CCGGCGGTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCATTACAAGCCTGAATAATGGTGATGGAATAATGGAATAGGACCTCGGTT
 CTATTTTGTGGTTTTCGAACTGGAGGTAATGATTAACAGGGACAACGGGGGCGATTGCTATTGCGGCGTTAGAGGTGAAATTTCTGGATCGC
 CGAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTGTCAAGAATGTTTTATTAGTCAAGAACGAAAGTCAAGGCGCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGT
 GTTCTGACCATAAACTATGCCACCTGGCCATCCGCAGGAGTTGCTTCGATGACTCTGCGGGCGGCC-
 TCCGGGAACCAAGGTTTTGGGTTCGGGGGGAAGTATGTTGCAAAGCTGAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGA
 GCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTCACCCGGTCCGGACACTGTAAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTTCTTGATTGCGTGGGT
 GGTGGTGATGGCGTTCTAGTTGGTGAGCGATTGTCTGGTTAATTCGATAACGAACGAgACTCTAGCCTATTAATAGTTTCGCTCGGTG
 GTTCTATTGCCGACGGCGTACACTCTTAGAGGGACGAGTGGCGTTAGCCACACGAAATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTC
 CGGGGCGCACGCGCGCTACACTGAAGGAATCAGCGTGGATGCCTCCCTGGCCCCGAAAGGGCTGGGAAACCCGTTGAATCTCCTTCGTGCTAG
 GGATTGGGGCTTGAATTTGTTCCCATGAACGAGGAATCCAGTAAGcGcGAGTCATAAGCTCGCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACAC
 CGCCCGTCGCTACTATCGATTGAGCGGTTCAGTGAGGGCCTCGGACTGGTCTCGGTCTGGCGTGCAAGCGCCGGCACCGTTGGCCGGGAAGAC
 GCTCGAACTCGATCGCTtGg

>Am14

AGTCATATGCTTGCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTTCACACTGTTTGACGGTGAAACCGCAATGGCTCATTAAATCAGTCGAGGTT
 CCTTAGATGACACGATCCTACTTGGATAACTGTGGCAATTCTAGAGCTAATACATGCTTACCAAGCTCCGACCTTTATTGGAAAGAGCGcTTTTAT
 TAGTTCAAACCAATCGCCGGCCATTCACTTGCCTGGTGGTGTCCCATTTGGTGACTcTGGATAACTTTGTGCTGATCGCATGGCCTTCGT
 GCCGGCGACGCATCTTTCAAATGTCTGCCCTATCAAATGTGATGGTACGTGATATGCCCTACCATGTTTGTAAACGGGTAACGGGGAATCAGGGTT
 CGATTCCGGAGAGGGAGCATGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAACTTACCCACTCCCGGCACGGGGAGGTAGTG
 ACGAAAAATAACAATACGGGACTCTTCGAGGCCCGTAATTTGGAATGAGTACACTTTAAACCTTTAACGAGGATCTATTGGAGGGCAAGTCT
 GGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCTCGGGTGACAGCGGGC
 GGTCCGGCTCGCGCGGTTCACTGCCGTATTAATCCTGCCCTACTTGTCTGCCGGCTCTCTCCCGGGGTGCTCTTCGCTGAGCGTCCCGGGTG
 GCCGGCGGTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCATTACAAGCCTGAATAATGGTGATGGAATAATGGAATAGGACCTCGGT
 TCTATTTGTTGTTTTCGAACTGGAGGTAATGATTAACAGGGACAACGGGGGCGATTGCTATTGCGGCGTTAGAGGTGAAATTTCTGGATCG
 CCGCAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTGTCAAGAATGTTTTATTAGTCAAGAACGAAAGTCAAGGCGCGAAGACGATCAGATACCGTCGT
 AGTTCTGACCATAAACTATGCCACCTGGCCATCCGCAGGAGTTGCTTCGATGACTCTGCGGGCGGCC-
 TCCGGGAACCAAGGTTTTGGGTTCGGGGGGAAGTATGTTGCAAAGCTGAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGA
 GCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTCACCCGGTCCGGACACTGTAAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTTCTTGATTGCGTGGGT
 GGTGGTGATGGCGTTCTAGTTGGTGAGCGATTGTCTGGTTAATTCGATAACGAACGAgACTCTAGCCTATTAATAGTTTCGCTCGGTG
 GTTCTATTGCCGACGGCGTACACTCTTAGAGGGACGAGTGGCGTTAGCCACACGAAATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTC
 CGGGGCGCACGCGCGCTACACTGAAGGAATCAGCGTGGATGCCTCCCTGGCCCCGAAAGGGCTGGGAAACCCGTTGAATCTCCTTCGTGCTAG
 GGATTGGGGCTTGAATTTGTTCCCATGAACGAGGAATCCAGTAAGcGcGAGTCATAAGCTCGCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACAC
 CCGCCCGTCGCTACTATCGATTGAGCGGTTCAGTGAGGGCCTCGGACTGGTCTCGGTCTGGCGTGCAAGCGCCGGCACCGTTGGCCGGGAAGAC
 CGCTCGAACTCGATCGCTtGg

>Am15

AGTCATATGCTTGCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTTCACAcTgTTTGACGGTGAAACCGcGAATGGCTCATTAAATCAGTCGAGGTTc
 cTTAGATGACACGATCCTACTTGGATAACTGTGGCAATTCTAGAGCTAATACATGCTTACCAAGCTCCGACCTTTATTGGAAAGAGcgcTTTTATTa
 GTTCAAACCAATCGCCGCTCTTC-----
 GCGAGGGCGGTGTCCCATTTGGTGACTcTGGATAACTTTGTGCTGATCGCATGGCCTTCGTgCcGGCGACGCATCTTTCAAATGTcgcCtATCAA

ATGTcgATGGTACGTGATATGCCTACCATGTTTGTAAACGGGTAAACGGGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCAtGAGAAACGGcTACCA
CATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGcCAACTTACCCACTCCCGGCACGGGGAGGTAGtGAcGAAAAATAACAATACGGGACTCTTTTCGAGGCCCGC
TAATtGGAATGAGTACACTTTAAACCTTTAACGAGGATCTATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCAGCTCCAATAGCGT
ATATTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCTCGGGTGACAGCGGGCGGTCCGGCTCGCGCCGTTTCACTGCCCGTATTAAATCCT
GCCCTACTTGTCTGCCGGCTCTCTCCGCGGGTGCTCTTCGCTGAGCGTCCCGGGTGGCCGGCGCGTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAA
GCAGGCATTACAAGCCTGAATAATGGTGCATGGAATAATGGAATAGGACCTCGGTTCTATTTTGTGGTTTTCGAACTGGAGGTAATGATTAA
CAGGGACAACCGGGGGCATTGCTATTGCGGCGTAGAGGTGAAATCTTGGATCGCCGCAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTGTCAAGAAT
GTTTTATTAGTCAAGAACGAAAGTCAGAGGCGCGAAGACGATCAGATACCGTCTGAGTTCTGACCATAAATATGCCACCTGGCCATCCGCGAG
GAGTTGCTTCGATGACTCTCGGGCGGCC-

TCCGGGAAACCAAAGTTTTGGGTTCCGGGGGAAGTATGGTTGCAAAGCTGAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGA
GCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTCACCGGTCCGGACACTGTAAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTTCTTGATTCGGTGGGT
GGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGCGATTGTCTGGTTAATCCGATAACGAACGAGACTCTAGCCTATTAATAGTTCGCCTCGGTG
GTTCTATTGCCGACGGCGTACACTTCTAGAGGGACGAGTGGCGTTAGCCACACGAAATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTC
CGGGGCCGACGCGCGCTACACTGAAGGAATCAGCGTGGATGCCTCCCTGGCCGAAAGGGCTGGGAAACCCGTTGAATCTCCTTCGTGCTAG
GGATTGGGGCTTGTAATTGTTCCCATGAACGAGGAATCCAGTAAGCGCGAGTCATAAGCTCGCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACA
CCGCCGTCGCTACTATCGATTGAGCGGTTAGTGAGGGCCTCGGACTGGTCTCGGTCTGGCGTGCAAGCGCCGGCACCGTTGGCCGGGAAGA
CgCTCGAACTCGATCGCTTG

>Am16

AGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTTCACACTGTTTGACGGTGAAACCGCGAATGGCTCATTAAATCAGTCGAGGTT
CctTAGATGACAGATCCTACTTGGATAACTGTGGCAATTCTAGAGCTAATACATGCTTACCAAGCTCCGACCTTTATTGAAAGAGcGcTTTTATT
aGTTCAAACCAATCGCGTCCTTTC-----

GCGAGGGCGGTGTCCCATTTGGTACTcTGGATAACTTTGTGCTGATCGCATGGCCTTCGTGcCGGCGACGCATCTTTCAAATGTcGcCcTATCA
AATGTcGatGGTACGTGATATGCCTACCATGTTTGTAAACGGGTAAACGGGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCATGAGAAACGGcTACC
ACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAACTTACCCACTCCCGGCACGGGGAGGTAGTgAcGAAAAATAACAATACGGGACTCTTTTCGAGGCC
CgTAAtTGAATGAGTACACTTTAAACCTTTAACGAGGATCTATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCAGCTCCAATAGC
GTATATTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCTCGGGTGACGGCGGGCGGTCCGGCTCGCGCCGTTCACTGCCCGTATTAAT
CCTGCCCTACTTGTCTGCCGGCTCTCTCCGCGGGTGCTCTTCGCTGAGCGTCCCGGGTGGCCGGCGCGTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTC
AAGCAGGCATTACAAGCCTGAATAATGGTGCATGGAATAATGGAATAGGACCTCGGTTCTATTTTGTGGTTTTCGGAACTGGAGGTAATGATT
AACAGGGACAACCGGGGGCATTCTGATTGCGGCGTTAGAGGTGAAATCTTGGATCGCCGCAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTGTGCAAGA
ATGTTTTATTAGTCAAGAACGAAAGTCAGAGGCGCGAAGACGATCAGATACCGTCTGAGTTCTGACCATAAACTATGCCACCTGGCCATCCGCA
GGAGTTGCTTCGATGACTCTCGGGCGGCC-

TCCGGGAAACCAAAGTTTTGGGTTCCGGGGGAAGTATGGTTGCAAAGCTGAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGA
GCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTCACCGGTCCGGACACTGTAAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTTCTTGATTCGGTGGGT
GGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGCGATTGTCTGGTTAATCCGATAACGAACGAgACTCTAGCCTATTAATAGTTCGCCTCGGTG
GTTCTATTGCCGACGGCGTACACTTCTAGAGGGACGAGTGGCGTTAGCCACACGAAATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTC
CGGGGCCGACGCGCGCTACACTGAAGGAATCAGCGTGGATGCCTCCCTGGCCGAAAGGGCTGGGAAACCCGTTGAATCTCCTTCGTGCTAG
GGATTGGGGCTTGTAATTGTTCCCATGAACGAGGAATCCAGTAAGCGCGAGTCATAAGCTCGCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACA
CCGCCGTCGCTACTATCGATTGAGCGGTTAGTGAGGGCCTCGGACTGGTCTCGGTCTGGCGTGCAAGCGCCGGCACCGTTGGCCGGGAAGA
CgCTCGAACTCgATCGCTTG

>Am18

AGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTTCACACTGTTTGACGGTGAAACCGcGAATGGCTCATTAAATCAGTCGAGGTT
CTTAGATGACAGATCCTACTTGGATAACTGTGGCAATTCTAGAGCTAATACATGCTTACCAAGCTCCGACCTTTATTGAAAGAGcGcTTTTATTa
GTTCAAACCAATcCGCTCCTTTC-----

GCGAGGGCGGTGTCCCATTTGGTACTcTGGATAACTTTGTGCTGATCGCATGGCCTTCGTgCCGGCGACGCATCTTTCAAATGTCTGCCCTATCA
AATGTcGATGGTACGTGATATGCCTACCATGTTTGTAAACGGGTAAACGGGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCATGAGAAACGGcTAC
CACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAACTTACCCACTCCCGGCACGGGGAGGTAGTgAcGAAAAATAACAATACGGGACTCTTTTCGAGGCC
CGTAAhTGAATGAGTACACTTTAAACCTTTAACGAGGATCTATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCAGCTCCAATAG
CGTATATTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCTCGGGTGACGGCGGGCGGTCCGGCTCGCGCCGTTTCACTGCCCGTATTAA
TCCTGCCCTACTTGTCTGCCGGCTCTCTCCGCGGGTGCTCTTCGCTGAGCGTCCCGGGTGGCCGGCGCGTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTC
AAAGCAGGCATTACAAGCCTGAATAATGGTGCATGGAATAATGGAATAGGACCTCGGTTCTATTTTGTGGTTTTCGGAACTGGAGGTAATGA
TTAACAGGGACAACCGGGGGCATTCTGATTGCGGCGTTAGAGGTGAAATCTTGGATCGCCGCAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTGTCAAG
AATGTTTTATTAGTCAAGAACGAAAGTCAGAGGCGCGAAGACGATCAGATACCGTCTGAGTTCTGACCATAAATATGCCACCTGGCCATCCG
AGGAGTTGCTTCGATGACTCTCGGGCGGCC-

TCCGGGAAACCAAAGTTTTGGGTTCCGGGGGAAGTATGGTTGCAAAGCTGAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGA
GCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTCACCGGTCCGGACACTGTAAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTTCTTGATTCGGTGGGT
GGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGCGATTGTCTGGTTAATCCGATAACGAACGAGACTCTAGCCTATTAATAGTTCGCCTCGGTG
GTTCTATTGCCGACGGCGTACACTTCTAGAGGGACGAGTGGCGTTAGCCACACGAAATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTC
CGGGGCCGACGCGCGCTACACTGAAGGAATCAGCGTGGATGCCTCCCTGGCCGAAAGGGCTGGGAAACCCGTTGAATCTCCTTCGTGCTAG
GGATTGGGGCTTGTAATTGTTCCCATGAACGAGGAATCCAGTAAGCGCGAGTCATAAGCTCGCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACA
CCGCCGTCGCTACTATCGATTGAGCGGTTAGTGAGGGCCTCGGACTGGTCTCGGTCTGGCGTGCAAGCGCCGGCACCGTTGGCCGGGAAGA
CGCTCGAACTCGATCGCTTG

>Am19

AGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTTCACACTGTTTGACGGTGAAACCGcGAATGGCTCATTAAATCAGTCGAGGTT
CTTAGATGACAGATCCTACTTGGATAACTGTGGCAATTCTAGAGCTAATACATGCTTACCAAGCTCCGACCTTTATTGAAAGAGcGcTTTTATTa
GTTCAAACCAATcCGCTCCTTTC-----

GCGAGGGCGGTGTCCCATTTGGTACTcTGGATAACTTTGTGCTGATCGCATGGCCTTCGTGCCGCGACGCATCTTTCAAATGTcGCCCTATCA
AATGTcGATGGTACGTGATATGCCTACCATGTTTGTAAACGGGTAAACGGGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCAtGAGAAACGGcTACC
ACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAACTTACCCACTCCCGGCACGGGGAGGTAGTgAcGAAAAATAACAATACGGGACTCTTTTCGAGGCC

CGTAattGGAATGAGTACACTTTAAACCCTTTAAACGAGGATCTATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAAATCCAGCTCCAATAGC
GTATATTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCTCGGGTGACGGCGGGCGGTCCGGCTCGCGCCGGTTACTGCCCCGATTAAAT
CCTGCCCTACTTGTCTGCCGGCTCTCTCCCGGGGTGCTCTTCGCTGAGCGTCCCGGGTGCCGGCGCGGTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTCA
AAGCAGGCATTACAAGCCTGAATAATGGTGCATGGAATAATGGAATAGGACCTCGGTTCTATTTTGTGGTTTTCGAACTGGAGGTAATGATT
AACAGGGACAACCGGGGGCATTCTGATTGCGCGTTAGAGGTGAAATCTTGATCGCCGCAAGACGAACACTACTGCGAAAGCATTGTCAAGA
ATGTTTTTATTAGTCAAGAACGAAAGTCAGAGGCGCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTTCTGACCATAAATATGCCACCTGGCCATCCGCA
GGAGTTGCTTCGATGACTCTGCGGGCGGCC-

TCCGGGAAACCAAGGTTTTGGGTTCCGGGGGAAGTATGGTTGCAAAGCTGAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGA
GCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAACTCACCCGGTCCGGACACTGTAAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTTCTTGATTCCGTTGGGT
GGTGGTGCATGGCCGTTCTAGTTGGTGGAGCGATTTGTCTGGTTAATCCGATAACGAACGAGACTCTAGCCTATTAATAAGTTCCGCTCGGTG
GTTCTATTGCCGACGGCGTACACTTCTAGAGGGACGAGTGCGGTTAGCCACACGAAATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTC
CGGGGCCGACGCGCTACACTGAAGGAATCAGCGTGGATGCCTCCCTGGCCGAAAGGGCTGGGAAACCCGTTGAATCTCCTTCGTGCTAG
GGATTGGGGCTTGAATTTGTTCCCATGAACGAGGAATCCAGTAAGCGCGAGTCATAAGCTCGCGTTGATTACGTCCTCGCCCTTTGTACACA
CCGCCGTCGCTACTATCGATTGAGCGGTTCACTGAGGGCCTCGGACTGGTCTCGGTCTGGCGTGAAGCGCCGGCACCCTTGCCGGGAAGA
CGCTCGAACTCGATCGCTTG

>Am20

AGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTTCACACTGTTTGACGGTGAAACCGCAATGGCTCATTAAATCAGTCGAGGTT
CCTTAGATGACACGATCCTACTTGGATAACTGTGGCAATTCTAGAGCTAATACATGCTTACCAAGCTCCGACCTTTATTGGAAAGAGCGCTTTTAT
TAGTTCAAACCAATCGCCGTCCTTC-----

GCGAGGGCGGTGTCCCCATTGGTGACTcTGGATAACTTTGTGCTGATCGCATGGCCTTCGTGCCGGCGACGCATCTTTCAAATGTcTGCCCTATCA
AATGTcGATGGTACGTGATATGCCTACCATGTTTGTAAACGGGTAAACGGGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCATGAGAAACGGcTACC
ACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAACTTACCCTCCCGCACGGGGAGGTAGtGAcGAAAAATAACAATACGGGACTCTTTGAGGGCCCC
GTAAttGGAATGAGTACACTTTAAACCTTTAACGAGGATCTATTGAGGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATCCAGCTCCAATAGCG
TATATTAAAGTTGTTGCAATTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCTCGGGTGACGGCGGGCGGTCCGGCTCGCGCCGGTTACTGCCCGTATTAAATCC
TGCCCTACTTGTCTGCCGGCTCTCTCCCGGGGTGCTCTTCGCTGAGCGTCCCGGGTGCCGGCGCGTTCCTTTGAAAAAATTAGAGTGTTCAA
AGCAGGCATTACAAGCCTGAATAATGGTGCATGGAATAATGGAATAGGACCTCGGTTCTATTTTGTGGTTTTCGAACTGGAGGTAATGATTA
ACAGGGACAACGGGGGCGATTCTGATTGCGGCGTTAGAGGTGAAATCTTGATCGCCGCAAGACGAACACTACTGCGAAAGCATTGTCAAGAA
TGTTTTATTAGTCAAGAACGAAAGTCAGAGGCGCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTTCTGACCATAAATATGCCACCTGGCCATCCGACG
GAGTTGCTTCGATGACTCTGCGGGCGGCC-

TCCGGGAAACCAAGGTTTTGGGTTCCGGGGGAAGTATGGTTGCAAAGCTGAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGAG
CCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAACTCACCCGGTCCGGACACTGTAAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTTCTTGATTCCGTTGGGTG
GTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGCGATTTGTCTGGTTAATCCGATAACGAACGAGACTCTAGCCTATTAATAAGTTCCGCTCGGTG
TTCTATTGCCGACGGCGTACACTTCTAGAGGGACGAGTGCGGTTAGCCACACGAAATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAgATGTCC
GGGGCCGACGCGCGCTACACTGAAGGAATCAgCGTGATGCTCCCTGGCCGAAAGGGCTGGGAAACCCGTTGAATCTCCTTCGTGCTAGG
GATTGGGGCTTGAATTTGTTCCCATGAACGAGGAATCCAGTAAGCGCGAGTCATAAGCTCGCGTTGATTACGTCCTCGCCCTTTGTACACAC
CGCCGTCGCTACTATCGATTGAGCGGTTCACTGAGGGCCTCGGACTGGTCTCGGTCTGGCGTGAAGCGCCGGCACCCTTGCCGGGAAGAC
GCTCGAACTGATCGCTTG

>Am23

AGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTTCACACTGTTTGACGGTGAAACCGCAATGGCTCATTAAATCAGTCGAGGTT
CCTTAGATGACACgATCCTACTTGGATAACTGTGGCAATTCTAGAgcTAATACATGCTTACCAAGCTCCGACCTTTATTGGAAAGAGCGCTTTTATT
AGTTCAAACCAATCGCCGTCCTTC-----

GCGAGGGCGGTGTCCCCATTGGTGACTCTGGATAACTTTGTGCTGATCGCATGGCCTTCGTGCCGGCGACGCATCTTTCAAATGTCTGCCCTATC
AAATGTcGATGGTACGTGATATGCCTACCATGTTTGTAAACGGGTAAACGGGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCATGAGAAACGGcTA
CCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAACTTACCCTCCCGCACGGGGAGGTAGTGACGAAAAATAACAATACGGGACTCTTTGAGGC
CCCGTAAttGGAATGAGTACACTTTAAACCTTTAACGAGGATCTATTGAGGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATCCAGCTCCAATA
GCGTATATTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCTCGGGTGACGGCGGGCGGTCCGGCTCGCGCCGGTTCACTGCCCGTATTAA
ATCCTGCCCTACTTGTCTGCCGGCTCTCTCCCGGGGTGCTCTTCGCTGAGCGTCCCGGGTGCCGGCGCGTTCCTTTGAAAAAATTAGAGTGTT
CAAAGCAGGCATTACAAGCCTGAATAATGGTGCATGGAATAATGGAATAGGACCTCGGTTCTATTTTGTGGTTTTCGAACTGGAGGTAATG
ATTAACAGGGACAACGGGGGCGATTCTGATTGCGGCGTTAGAGGTGAAATCTTGATCGCCGCAAGACGAACACTACTGCGAAAGCATTGTCAA
GAATGTTTTATTAGTCAAGAACGAAAGTCAGAGGCGCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTTCTGACCATAAATATGCCACCTGGCCATCC
GCAGGAGTTGCTTCGATGACTCTGCGGGCGGCC-

TCCGGGAAACCAAGGTTTTGGGTTCCGGGGGAAGTATGGTTGCAAAGCTGAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGA
GCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAACTCACCCGGTCCGGACACTGTAAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTTCTTGATTCCGTTGGGT
GGTGGTGCATGGCCGTTCTAGTTGGTGGAGCGATTTGTCTGGTTAATCCGATAACGAACGAGACTCTAGCCTATTAATAAGTTCCGCTCGGTG
GTTCTATTGCCGACGGCGTACACTTCTAGAGGGACGAGTGCGGTTAGCCACACGAAATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTC
CGGGGCCGACGCGCGCTACACTGAAGGAATCAGCGTGGATGCCTCCCTGGCCGAAAGGGCTGGGAAACCCGTTGAATCTCCTTCGTGCTAG
GGATTGGGGCTTGAATTTGTTCCCATGAACGAGGAATCCAGTAAGCGCGAGTCATAAGCTCGCGTTGATTACGTCCTCGCCCTTTGTACACA
CCGCCGTCGCTACTATCGATTGAGCGGTTCACTGAGGGCCTCGGACTGGTCTCGGTCTGGCGTGAAGCGCCGGCACCCTTGCCGGGAAGA
CGCTCGAACTCGATCGCTTG

>Am24

AGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTTCACACTGTTTGACGGTGAAACCGcGAATGGCTCATTAAATCAGTCGAGGTTc
CTTAGATGACACGATCCTACTTGGATAACTGTGGCAATTCTAGAGCTAATACATGCTTACCAAGCTCCGACCTTTATTGGAAAGAGcGcTTTTATTA
GTTCAAACCAATCgCCGTCCTTC-----

GCGAGGGCGGTGTCCCCATTGGTGACTcTGGATAACTTTGTGCTGATCGCATGGCCTTCGTGCCGGCGACGCATCTTTCAAATGTcTGCCCTATCA
AATGTcGATGGTACGTGATATGCCTACCATGTTTGTAAACGGGTAAACGGGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCATGAGAAACGGcTAC
CACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAACTTACCCTCCCGCACGGGGAGGTAGTGAcGAAAAATAACAATACGGGACTCTTTGAGGCC
CCGTAAttGGAATGAGTACACTTTAAACCTTTAACGAGGATCTATTGGAGGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATCCAGCTCCAATAG
CGTATATTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCTCGGGTGACGGCGGGCGGTCCGGCTCGCGCCGGTTACTGCCCGTATTAA

TCCTGCCCTACTTGTCTGCCGGCTCTCTCCCGGGGTGCTCTTCGCTGAGCGTCCCGGGTGCCGGCGCGTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTT
 AAAGCAGGCATTACAAGCTGAATAATGGTGCATGGAATAATGGAATAGGACCTCGGTTCTATTTTGGTTTTCGGAACCTGGAGGTAATGA
 TTAACAGGGACAAACGGGGGCGATTCTGATTGCGGCGTTAGAGGTGAAATCTTGGATCGCCGCAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTGTCAAG
 AATGTTTTATTAGTCAAGAACGAAAGTCAGAGCGCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTTCTGACCATAAATATGCCACCTGGCCATCCGC
 AGGAGTTGCTTCGATGACTCTGCGGGCGGCC-
 TCCGGGAAACCAAGGTTTTGGGTTCCGGGGGAAGTATGGTTGCAAAGCTGAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGA
 GCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTCACCCGGTCCGGACACTGTAAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTTCTTGATTGGTGGGT
 GGTGGTGCATGGCGTTCTTAGTTGGTGGAGCGATTGTCTGGTTAATCCGATAACGAACGAGACTCTAGCCTATTAATAGTTCCGCTCGGTG
 GTTCTATTGCCGACGGCGTACACTCTTAGAGGGACGAGTGGCGTTAGCCACACGAAATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTC
 CGGGCCGACGCGCTACACTGAAGGAATCAGCGTGGATGCCTCCCTGGCCGAAAGGGCTGGGAACCCGTTGAATCTCCTTCGTGCTAG
 GGATTGGGGCTTGAATTGTTCCCATGAACGAGGAATCCAGTAAGCGCGAGTCATAAGCTCGCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACA
 CCGCCGTCGCTACTATCGATTGAGCGGTTCACTGAGGGCCTCGGACTGGTCTCGGTCTGGCTGCAAGCGCCGGCACCGTTGGCCGGGAAGA
 CGCTCGAACTCGATCGTTGG

>Am25

AGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTTCACACTGTTTGACGGTGAAACCGCGAATGGCTCATTAAATCAGTCGAGGTT
 CcTTAGATGACACGATCCTACTTGGATAACTGTGGCAATTCTAGAGCTAATACATGCTTACCAAGCTCCGACCTTTATTGAAAAGAGCGcTTTTAT
 AGTTCAAACCAATCGCGGCCATTCACTTGCCTGGTGGTGTGCCATTGGTGACTcTGGATAACTTTGTGCTGATCGCATGGCCTTCGTG
 CCGGCGACGCATCTTCAAATGTcTGCCCTATCAAATGTcGATGGTACGTGATATGCCTACCATGTTTGAACGGGTAAACGGGGAATCAGGGTTC
 GATTCCGGAGAGGGAGCATGAGAAACGGcTACCACATCCAAGGAAGGCGAGGCGCGCAACTTACCCACTCCCGGCACGGGGAGGTAGTGA
 CGAAAAATAACAATACGGGACTCTTTCGAGGCCCGTAATGGAATGAGTACACTTTAAACCTTTAACGAGGATCTATTGGAGGGCAAGTCTGG
 TGCCAGCAGCCGCGGTAACTTCAGTCCAATAGCGTATTAAGTTGTTGCAAGTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCTCGGGTGCAGGCGGGCGG
 TCCGGCTCGCGCCGGTTCACTGCCGTATTAATCTCGCTACTTGTCTGCCGGCTCTCTCCCGGGGTGCTCTTCGCTGAGCGTCCCGGGTGGC
 CGGCGCGTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCATTACAAGCCTGAATAATGGTGCATGGAATAATGGAATAGGACCTCGGTTT
 TATTTTGTGGTTTTCGAACTGGAGGTAATGATTAAACAGGGACAAACGGGGGCGATTCTGATTGCGGCGTTAGAGGTGAAATCTTGGATCGCC
 GCAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTGTCAAGATGTTTTATTAGTCAAGAACGAAAGTCAGAGGCGCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAG
 TTCTGACCATAAACTATGCCACTGGCCATCCGACGAGTGTCTTCGATGACTCTCGGGCGGCC-
 TCCGGGAAACCAAGGTTTTGGGTTCCGGGGGAAGTATGGTTGCAAAGCTGAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGA
 GCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTCACCCGGTCCGGACACTGTAAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTTCTTGATTGGTGGGT
 GGTGGTGCATGGCGTTCTTAGTTGGTGGAGCGATTGTCTGGTTAATCCGATAACGAACGAGACTCTAGCCTATTAATAGTTCCGCTCGGTG
 GTTCTATTGCCGACGGCGTACACTCTTAGAGGGACGAGTGGCGTTAGCCACACGAAATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTC
 CGGGCCGACGCGCGCTACACTGAAGGAATCAGCGTGGATGCCTCCCTGGCCGAAAGGGCTGGGAACCCGTTGAATCTCCTTCGTGCTAG
 GGATTGGGGCTTGAATTGTTCCCATGAACGAGGAATCCAGTAAGCGCGAGTCATAAGCTCGCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACA
 CCGCCGTCGCTACTATCGATTGAGCGGTTCACTGAGGGCCTCGGACTGGTCTCGGTCTGGCTGCAAGCGCCGGCACCGTTGGCCGGGAAGA
 CGCTCGAACTCGATCGTTGG

>Am26

AGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTTCACACTGTTTGACGGTGAAACCGCGAATGGCTCATTAAATCAGTCGAGGTT
 CcTTAGATGACACGATCCTACTTGGATAACTGTGGCAATTCTAGAGCTAATACATGCTTACCAAGCTCCGACCTTTATTGAAAAGAGCGCTTTTAT
 TAGTTCAAACCAATcCGCGCCATTCACTTGCCTGGTGGTGTGCCATTGGTGACTcTGGATAACTTTGTGCTGATCGCATGGCCTTCGTG
 CCGGCGACGCATCTTCAAATGTCTGCCCTATCAAATGTGATGGTACGTGATATGCCTACCATGTTTGAACGGGTAAACGGGGAATCAGGGTTC
 GATTCCGGAGAGGGAGCATGAGAAACGGcTACCACATCCAAGGAAGGCGAGGCGCGCAACTTACCCACTCCCGGCACGGGGAGGTAGTGA
 CGAAAAATAACAATACGGGACTCTTTCGAGGCCCGTAATGGAATGAGTACACTTTAAACCTTTAACGAGGATCTATTGGAGGGCAAGTCTGG
 TGCCAGCAGCCGCGGTAACTTCAGTCCAATAGCGTATTAAGTTGTTGCAAGTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCTCGGGTGCAGGCGGGCGG
 TCCGGCTCGCGCCGGTTCACTGCCGTATTAATCTCGCTACTTGTCTGCCGGCTCTCTCCCGGGGTGCTCTTCGCTGAGCGTCCCGGGTGGC
 CGGCGCGTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCATTACAAGCCTGAATAATGGTGCATGGAATAATGGAATAGGACCTCGGTTT
 TATTTTGTGGTTTTCGAACTGGAGGTAATGATTAAACAGGGACAAACGGGGGCGATTCTGATTGCGGCGTTAGAGGTGAAATCTTGGATCGCC
 GCAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTGTCAAGATGTTTTATTAGTCAAGAACGAAAGTCAGAGGCGCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAG
 TTCTGACCATAAACTATGCCACTGGCCATCCGACGAGTGTCTTCGATGACTCTCGGGCGGCC-
 TCCGGGAAACCAAGGTTTTGGGTTCCGGGGGAAGTATGGTTGCAAAGCTGAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGA
 GCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTCACCCGGTCCGGACACTGTAAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTTCTTGATTGGTGGGT
 GGTGGTGCATGGCGTTCTTAGTTGGTGGAGCGATTGTCTGGTTAATCCGATAACGAACGAGACTCTAGCCTATTAATAGTTCCGCTCGGTG
 GTTCTATTGCCGACGGCGTACACTCTTAGAGGGACGAGTGGCGTTAGCCACACGAAATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTC
 CGGGCCGACGCGCGCTACACTGAAGGAATCAGCGTGGATGCCTCCCTGGCCGAAAGGGCTGGGAACCCGTTGAATCTCCTTCGTGCTAG
 GGATTGGGGCTTGAATTGTTCCCATGAACGAGGAATCCAGTAAGCGCGAGTCATAAGCTCGCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACA
 CCGCCGTCGCTACTATCGATTGAGCGGTTCACTGAGGGCCTCGGACTGGTCTCGGTCTGGCTGCAAGCGCCGGCACCGTTGGCCGGGAAGA
 CGCTCGAACTCGATCGTTGG

>Am27

AGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTTCACACTGTTTGACGGTGAAACCGCGAATGGCTCATTAAATCAGTCGAGGTT
 CcTTAGATGACACGATCCTACTTGGATAACTGTGGCAATTCTAGAGCTAATACATGCTTACCAAGCTCCGACCTTTATTGAAAAGAGCGCTTTTAT
 TaGTTCAAACCAATcCGGTCCTTTT-----
 GCGAGGGCGGTGTCCTCATTGGTGACTcTGGATAACTTTGTGCTGATCGCATGGCCTTCGTgCCGGCGACGCATCTTCAAATGTCTGCCCTATCA
 AATGTGATGGTACGTGATATGCCTACCATGTTTGAACGGGTAAACGGGGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCATGAGAAACGGcTAC
 CACATCCAAGGAAGGACGAGGCGCGCAACTTACCACTCCCGGCACGGGGAGGTAGTGAcGAAAAATAACAATACGGGACTCTTTCGAGGCC
 CGGTAAGGGAATGAGTACACTTTAAACCTTTAACGAGGATCTATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAAATCCAGCTCCAATAG
 CGTATATTAAGTTGTTGCAAGTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCTCGGGTGCAGGCGGGCGGTCCGGCTCGCGCCGGTTCACTGCCGTATTA
 TCCTGCCCTACTTGTCTGCCGGCTCTCTCCCGGGGTGCTCTTCGCTGAGCGTCCCGGGTGCCGGCGCGCTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTT
 AAAGCAGGCATTACAAGCTGAATAATGGTGCATGGAATAATGGAATAGGACCTCGGTTCTATTTTGGTTTTCGGAACCTGGAGGTAATGA
 TTAACAGGGACAAACGGGGGCGATTCTGATTGCGGCGTTAGAGGTGAAATCTTGGATCGCCGCAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTGTCAAG
 AATGTTTTATTAGTCAAGAACGAAAGTCAGAGGCGCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTTCTGACCATAAATATGCCACCTGGCCATCCGC

AGGAGTTGCTTCGATGACTCTGCGGGCGGCC-
TCCGGGAAACCAAGGTTTTGGGTTCCGGGGGAAGTATGGTTGCAAAGCTGAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGA
GCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAACTCACCCGGTCCGGACACTGTAAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTTCTTGATTCCGTTGGGT
GGTGGTGCATGGCCGTTCTAGTTGGTGGAGCGATTGTCTGGTTAATCCGATAACGAACGAGACTCTAGCCTATTAATAGTTCCGCTCGGTG
GTTCTATTGCCGACGGCGTACACTTCTAGAGGGACGAGTGCGGTTAGCCACACGAAATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTC
CGGGGCCGACGCGCGCTACACTGAAGGAATCAGCGTGGATGCCTCCTGCCCCGAAAGGGCTGGGAAACCCGTTGAATCTCCTTCGTGCTAG
GGATTGGGGCTTGAATTTGTTCCCATGAACGAGGAATCCAGTAAGCGCGAGTCATAAGCTCGCGTTGATTACGTCCTCGCCTTTGTACACA
CCGCCGTCGCTACTATCGATTGAGCGGTTAGTGAGGGCCTCGGACTGGTCTCGGTCTGGCGTGAAGCGCCGGCACCCTTGCCGGGAAGA
CGCTCGAACTCGATCGCTTG
>Am28
AGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTTCACACTGTTTGACGGTGAAACCGCGAATGGCTCATTAAATCAGTCGAGGTT
CCTTAGATGACACGATCCTACTTGGATAACTGTGGCAATTCTAGAGCTAATACATGCTTACCAAGCTCCGACCTTTATTGGAAAGAGCGCTTTAT
TaGTTCAAACCAATCgCCGTCCTTC-----
GCGAGGGCGGTGTCCCCATTGGTGACTcTGGATAACTTTGTGCTGATCGCATGGCCTTCGTGCCGGCGACGCATCTTTCAAATGTCTGCCCTATC
AAATGTcGATGGTACGTGATATGCCTACCATGTTTGTAAACGGGTAAACGGGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCATGAGAAACGGcTA
CCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAACTTACCACTCCCGGCACGGGGAGGTAGTGACGAAAAATAACAATACGGGACTCTTCGAGGC
CCCGTAaattGGAATGAGTACACTTTAAACCTTTAACGAGGATCTATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATA
GCGTATATTAAGTTGTTGCAAGTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCTCGGGTGACGGCGGGCGGTCCGGCTCGCGCCGTTCACTGCCCGTATTAA
ATCCTGCCCTACTTGTCTGCCGCTCTCTCCGCGGGTGTCTTCGCTGAGCGTCCCGGGTGGCCGGCGCGTTCCTTTGAAAAAATTAGAGTGTT
CAAAGCAGGCATTACAAGCCTGAATAATGGTGCATGGAATAATGGAATAGGACCTCGGTTCTATTTTGTGGTTTCGGAAGTGGAGGTAaTGA
TTAAACGGGACAAACGGGGCATTCTGATTGCGCGGTTAGAGGTGAAATCTTGGATCGCCGCAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGTCAAG
AATGTTTTATTAGTCAAGAACGAAAGTCAAGGCGCGAAGACGATCAGATACCGTCTGATGTTCTGACCATAAACTATGCCACCTGGCCATCCGC
AGGAGTTGCTTCGATGACTCTGCGGGCGGCC-
TCCGGGAAACCAAGGTTTTGGGTTCCGGGGGAAGTATGGTTGCAAAGCTGAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGA
GCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAACTCACCCGGTCCGGACACTGTAAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTTCTTGATTCCGTTGGGT
GGTGGTGCATGGCCGTTCTAGTTGGTGGAGCGATTGTCTGGTTAATCCGATAACGAACGAGACTCTAGCCTATTAATAGTTCCGCTCGGTG
GTTCTATTGCCGACGGCGTACACTTCTAGAGGGACGAGTGCGGTTAGCCACACGAAATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTC
CGGGGCCGACGCGCGCTACACTGAAGGAATCAGCGTGGATGCCTCCTGCCCCGAAAGGGCTGGGAAACCCGTTGAATCTCCTTCGTGCTAG
GGATTGGGGCTTGAATTTGTTCCCATGAACGAGGAATCCAGTAAGCGCGAGTCATAAGCTCGCGTTGATTACGTCCTCGCCTTTGTACACA
CCGCCGTCGCTACTATCGATTGAGCGGTTAGTGAGGGCCTCGGACTGGTCTCGGTCTGGCGTGAAGCGCCGGCACCCTTGCCGGGAAGA
CGCTCGAACTCGATCGCTTG
>Am29
AGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTTCACACTGTTTGACGGTGAAACCGCGAATGGCTCATTAAATCAGTCGAGGTT
CCTTAGATGACACGATCCTACTTGGATAACTGTGGCAATTCTAGAGCTAATACATGCTTACCAAGCTCCGACCTTTATTGGAAAGAGCGCTTTAT
TAGTTCAAACCAATCgCCGTCCTTC-----
GCGAGGGCGGTGTCCCCATTGGTGACTcTGGATAACTTTGTGCTGATCGCATGGCCTTCGTGCCGGCGACGCATCTTTCAAATGTCTGCCCTATC
AAATGTcGATGGTACGTGATATGCCTACCATGTTTGTAAACGGGTAAACGGGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCATGAGAAACGGcTA
CCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAACTTACCACTCCCGGCACGGGGAGGTAGTGACGAAAAATAACAATACGGGACTCTTCGAGGC
CCCGTAaattGGAATGAGTACACTTTAAACCTTTAACGAGGATCTATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATA
GCGTATATTAAGTTGTTGCAAGTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCTCGGGTGACGGCGGGCGGTCCGGCTCGCGCCGTTCACTGCCCGTATTAA
ATCCTGCCCTACTTGTCTGCCGCTCTCTCCGCGGGTGTCTTCGCTGAGCGTCCCGGGTGGCCGGCGCGTTCCTTTGAAAAAATTAGAGTGTT
CAAAGCAGGCATTACAAGCCTGAATAATGGTGCATGGAATAATGGAATAGGACCTCGGTTCTATTTTGTGGTTTCGGAAGTGGAGGTAATG
ATTAACaGGGACAAACGGGGCATTCTGATTGCGGCGTTAGAGGTGAAATCTTGGATCGCCGCAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGTCAA
GAATGTTTTATTAGTCAAGAACGAAAGTCAAGGCGCGAAGACGATCAGATACCGTCTGATGTTCTGACCATAAACTATGCCACCTGGCCATCC
GCAGGAGTTGCTTCGATGACTCTGCGGGCGGCC-
TCCGGGAAACCAAGGTTTTGGGTTCCGGGGGAAGTATGGTTGCAAAGCTGAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGA
GCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAACTCACCCGGTCCGGACACTGTAAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTTCTTGATTCCGTTGGGT
GGTGGTGCATGGCCGTTCTAGTTGGTGGAGCGATTGTCTGGTTAATCCGATAACGAACGAGACTCTAGCCTATTAATAGTTCCGCTCGGTG
GTTCTATTGCCGACGGCGTACACTTCTAGAGGGACGAGTGCGGTTAGCCACACGAAATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTC
CGGGGCCGACGCGCGCTACACTGAAGGAATCAGCGTGGATGCCTCCTGCCCCGAAAGGGCTGGGAAACCCGTTGAATCTCCTTCGTGCTAG
GGATTGGGGCTTGAATTTGTTCCCATGAACGAGGAATCCAGTAAGCGCGAGTCATAAGCTCGCGTTGATTACGTCCTCGCCTTTGTACACA
CCGCCGTCGCTACTATCGATTGAGCGGTTAGTGAGGGCCTCGGACTGGTCTCGGTCTGGCGTGAAGCGCCGGCACCCTTGCCGGGAAGA
CGCTCGAACTCGATCGCTTG
>Am30
AGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTTCACACTGTTTGACGGTGAAACCGCGAATGGCTCATTAAATCAGTCGAGGTT
CCTTAGATGACACGATCCTACTTGGATAACTGTGGCAATTCTAGAGCTAATACATGCTTACCAAGCTCCGACCTTTATTGGAAAGAGCGCTTTAT
TaGTTCAAACCAATCgCCGTCCTTC-----
GCGAGGGCGGTGTCCCCATTGGTGACTcTGGATAACTTTGTGCTGATCGCATGGCCTTCGTGCCGGCGACGCATCTTTCAAATGTCTGCCCTATC
AAATGTcGATGGTACGTGATATGCCTACCATGTTTGTAAACGGGTAAACGGGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCATGAGAAACGGcTAC
CACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAACTTACCACTCCCGGCACGGGGAGGTAGTGACGAAAAATAACAATACGGGACTCTTCGAGGCC
CCGTAaattGGAATGAGTACACTTTAAACCTTTAACGAGGATCTATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAG
CGTATATTAAGTTGTTGCAAGTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCTCGGGTGACGGCGGGCGGTCCGGCTCGCGCCGTTCACTGCCCGTATTAA
TCCTGCCCTACTTGTCTGCCGCTCTCTCCGCGGGTGTCTTCGCTGAGCGTCCCGGGTGGCCGGCGCGTTCCTTTGAAAAAATTAGAGTGTT
AAAGCAGGCATTACAAGCCTGAATAATGGTGCATGGAATAATGGAATAGGACCTCGGTTCTATTTTGTGGTTTCGGAAGTGGAGGTAATGA
TTAAACGGGACAAACGGGGCATTCTGATTGCGGCGTTAGAGGTGAAATCTTGGATCGCCGCAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGTCAA
AATGTTTTATTAGTCAAGAACGAAAGTCAAGGCGCGAAGACGATCAGATACCGTCTGATGTTCTGACCATAAACTATGCCACCTGGCCATCCGC
AGGAGTTGCTTCGATGACTCTGCGGGCGGCC-
TCCGGGAAACCAAGGTTTTGGGTTCCGGGGGAAGTATGGTTGCAAAGCTGAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGA

GCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTACCCGGTCCGGACACTGTAAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTTCTTGATTGGTGGGT
GGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGCGATTTGTCTGGTTAATTCGATAACGAACGAGACTCTAGCCTATTAAATAGTTCGCCTCGGTG
GTTCTATTGCCGACGGCGTACACTTCTAGAGGGACGAGTGGCGTTTAGCCACACGAAATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTC
CGGGGCGCACGCGCTACACTGAAGGAATCAGCGTGGATGCCTCCCTGGCCGAAAGGGCTGGGAAACCCGTTGAATCTCCTTCGTGCTAG
GGATTGGGGCTTGAATTTGTTCCCATGAACGAGGAATCCAGTAAGCGCGAGTCATAAGCTCGCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACA
CCGCGCGTGCCTACTATCGATTGAGCGGTTCACTGAGGGCCTCGGACTGGTCTCGGTCTGGCGTGCAAGCGCCGGCACCGTTGGCCGGGAAGA
CGCTCGAACTCGATCGCTTG

>Am31

AGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTTCACACTGTTTGACGGTGAAACCGcGAATGGCTCATTAAATCAGTCGAGGTTT
CTTAGATGACACGATCTACTTGGATAACTGTGGCAATTCTAGAGCTAATACATGCTTACCAAGCTCCGACCTTTATTGGAAAGAGGcGcTTTTATTa
GTTCAAACCAATCgCCGTCCTTC-----

GCGAGGGCGGTGTCCCATTTGGTACTcTGGATAACTTTGTGCTGATCGCATGGCCTTCGTGCCGCGACGCATCTTTCAAATGtTGCCTATCA
AATGTcGATGGTACGTGATATGCCTACCATGTTTGAACGGGTAAACGGGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCATGAGAAACGGcTACC
ACATCCAAGGAAGGACGAGCGCGCAACTTACCCACTCCCGGCACGGGGAGGTAGTGAcGAAAAATAACAATACGGGACTCTTTCGAGGGCC
CGTAATtGGAATGAGTACACTTTAAACCTTTAACGAGGATCTATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCAGCTCCAATAGC
GTATATTAAGTTGTTGCACTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCTCGGGTGAGGCGGGCGGTCCGGctcGgCCGgTTCAGTCCCGTATTAAATCC
TGCCCTActtGTCTGCCGCTCTCTCCCGGGGtgCTCTTCGTgAGCGTCCCGGGTGCCGCGCGGTTACTTTGAAAAAatAGAGTgtTCAAAGC
AGGcAttCACAAGcCTGAATAATGtGcAtGGAATAATgGAATAgGACctCGGtTctATtTTGTTGTTtTCGAAACTGGAGGTAAATGATTAAACGGG
ACAAACGGGGGcATTCTGATTGCGGCGTTAGAGGTGAAATCTTGGATCGCCGCAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGTCAAGAAATGTTTT
ATTAGTCAAGAACGAAAGTCAGAGCGCGGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTTCTGACCATAAACTATGCCACCTGGCCATCCGAGGAGTTG
CTTCGATGACTCTCGGGGCGGCC-

TCCGGgAAACCAAGGTTTTGGGTTCCGGGGGAAGTATGGTTGCAAAGCTGAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACAGGAGTGGAG
CCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTACCCGGTCCGGACACTGTAAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTTCTTGATTGGTGGGTG
GTGGTGCATGGCGTTCTTAGTTGGTGGAGCGATTGTCTGGTTAATTCGATAACGAACGAGACTCTAGCCTATTAATAGTTCGCCTCGGTGG
TTCTATTGCCGACGGCTACACTTCTTAGAGGGACGAGTGGCGTTTAGCCACACGAAATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTC
GGGCGCGCACGCGCTACACTGAAGGAATCAGCGTGGATGCCTCCCTGGCCGAAAGGGCTGGGAAACCCGTTGAATCTCCTTCGTGCTAGG
GATTGGGGCTTGAATTTGTTCCCATGAACGAGGAATCCAGTAAGCGCGAGTCATAAGCTCGCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACAC
CGCCCGTGCCTACTATCGATTGAGCGGTTCACTGAGGGCCTCGGACTGGTCTCGGTCTGGCGTGCAAGCGCCGGCACCGTTGGCCGGGAAGAC
GCTCGAACTCGATCGCTTG

>Am32

AGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTTCACACTGTTTGACGGTGAAACCGcGAATGGCTCATTAAATCAGTCGAGGTTT
CTTAGATGACACGATCTACTTGGATAACTGTGGCAATTCTAGAGCTAATACATGCTTACCAAGCTCCGACCTTTATTGGAAAGAGCGCTTTTATT
AGTTCAAACCAATCgCCGTCCTTC-----

GCGAGGGCGGTGTCCCATTTGGTACTcTGGATAACTTTGTGCTGATCGCATGGCCTTCGTGCCGCGACGCATCTTTCAAATGtTGCCTATC
AAATGTcGATGGTACGTGATATGCCTACCATGTTTGAACGGGTAAACGGGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCATGAGAAACGGcTA
CCACATCCAAGGAAGGACGAGCGCGCAACTTACCCACTCCCGGCACGGGGAGGTAGTGACGAAAAATAACAATACGGGACTCTTTCGAGGC
CCCGTAAtTGAATGAGTACACTTTAAACCTTTAACGAGGATCTATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCAGCTCCAATA
GCGTATATTAAGTTGTTGCACTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCTCGGGTGAGGCGGGCGGTCCGGCTCGCGCCGGTTCAGTCCCGTATTAA
ATCCTGCCCTACTTGTCTGCCGGCTCTCTCCCGGGGTGCTCTTCGTGAGCGTCCCGGGTGCCGCGCGGTTACTTTGAAAAAATAGAGTGT
CAAAGCAGGCATTACAAGCCTGAATAATGGTGCATGGAATAATGGAATAGGACCTCGGTTCTATTTTGTGGTTTTCGGAAGTGGAGGTAATG
ATTAACAGGGCAAAACGGGGCATTCTGATTGCGGCTTAGAGGTGAAATCTTGGATCGCCGCAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGTCAA
GAATGTTTTTATTAGTCAAGAACGAAAGTCAGAGCGCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTTCTGACCATAAACTATGCCACCTGGCCATCC
GCAGGAGTTGCTTCGATGACTCTCGGGCGGCC-

TCCGGGAAACCAAGGTTTTGGGTTCCGGGGGAAGTATGGTTGCAAAGCTGAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACAGGAGTGGGA
GCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTACCCGGTCCGGACACTGTAAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTTCTTGATTGGTGGGT
GGTGGTGCATGGCGTTCTTAGTTGGTGGAGCGATTTGTCTGGTTAATTCGATAACGAACGAGACTCTAGCCTATTAAATAGTTCGCCTCGGTG
GTTCTATTGCCGACGGGTACACTTCTTAGAGGGACGAGTGGCGTTTAGCCACACGAAATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTC
CGGGGCGCACGCGCTACACTGAAGGAATCAGCGTGGATGCCTCCCTGGCCGAAAGGGCTGGGAAACCCGTTGAATCTCCTTCGTGCTAG
GGATTGGGGCTTGAATTTGTTCCCATGAACGAGGAATCCAGTAAGCGCGAGTCATAAGCTCGCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACA
CCGCGCGTGCCTACTATCGATTGAGCGGTTCACTGAGGGCCTCGGACTGGTCTCGGTCTGGCGTGCAAGCGCCGGCACCGTTGGCCGGGAAGA
CGCTCGAACTCGATCGCTTG

>Am33

AGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTTCACACTGTTTGACGGTGAAACCGcGAATGGCTCATTAAATCAGTCGAGGTTT
CTTAGATGACACGATCTACTTGGATAACTGTGGCAATTCTAGAGCTAATACATGCTTACCAAGCTCCGACCTTTATTGGAAAGAGcGcTTTTATTA
GTTCAAACCAATCgCCGTCCTTC-----

GCGAGGGCGGTGTCCCATTTGGTACTcTGGATAACTTTGTGCTGATCGCATGGCCTTCGTGCCGCGACGCATCTTTCAAATGtTGCCTATC
AAATGTcGATGGTACGTGATATGCCTACCATGTTTGAACGGGTAAACGGGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCATGAGAAACGGcTA
CCACATCCAAGGAAGGACGAGCGCGCAACTTACCCACTCCCGGCACGGGGAGGTAGTGAcGAAAAATAACAATACGGGACTCTTTCGAGGC
CCCGTAAtTGAATGAGTACACTTTAAACCTTTAACGAGGATCTATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCAGCTCCAATA
GCGTATATTAAGTTGTTGCACTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCTCGGGTGAGGCGGGCGGTCCGGCTCGCGCCGGTTCAGTCCCGTATTAA
ATCCTGCCCTACTTGTCTGCCGGCTCTCTCCCGGGGTGCTCTTCGTGAGCGTCCCGGGTGCCGCGCGGTTACTTTGAAAAAATAGAGTGT
CAAAGCAGGCATTACAAGCCTGAATAATGGTGCATGGAATAATGGAATAGGACCTCGGTTCTATTTTGTGGTTTTCGGAAGTGGAGGTAATG
ATTAACAGGGCAAAACGGGGCATTCTGATTGCGGCTTAGAGGTGAAATCTTGGATCGCCGCAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGTCAA
GAATGTTTTTATTAGTCAAGAACGAAAGTCAGAGCGCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTTCTGACCATAAACTATGCCACCTGGCCATCC
GCAGGAGTTGCTTCGATGACTCTCGGGCGGCC-

TCCGGGAAACCAAGGTTTTGGGTTCCGGGGGAAGTATGGTTGCAAAGCTGAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACAGGAGTGGGA
GCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTACCCGGTCCGGACACTGTAAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTTCTTGATTGGTGGGT
GGTGGTGCATGGCGTTCTTAGTTGGTGGAGCGATTTGTCTGGTTAATTCGATAACGAACGAGACTCTAGCCTATTAAATAGTTCGCCTCGGTG

GTTCTATTGCCGACGGCGTACACTTCTTAGAGGGACGAGTGGCGTTAGCCACACGAAATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTC
CGGGGGCGCACGCGCGCTACACTGAAGGAATCAGCGTGGATGCCTCCCTGGCCGAAAGGGCTGGGAAACCCGTTGAATCTCCTTCGTGCTAG
GGATTGGGGCTTGAATTTGCCCATGAACGAGGAATCCACAGTAAGCGCGAGTCATAAGCTCGCGTTGATTACGTCCTCGCCCTTGTACACA
CCGCCCGTCGCTACTATCGATTGAGCGGTTCACTGAGGGCCTCGGACTGGTCTCGGTCTGGCGTGAAGCGCCGGCACCGTTGGCCGGGAAGA
CGCTCGAACTCGATCGCTTGG

>Am35

AGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTTCACACTGTTTGACGGTGAAACCGcGAATGGCTCATTAAATCAGTCGAGGTTT
cTTAGATGACACGATCCTACTTGGATAACTGTGGCAATTCTAGAGCTAATACATGCTTACCAAGCTCCGACCTTTATTGGAAGAGcGcTTTATTA
GTTCAAAACCAATcGCGTCCTTC-----
GCGAGGGCGGTGTCCCATTTGGTGAATcTGGATAACTTTGTGCTGATCGCATGGCCTTCGTGCCGGCGACGCATCTTTCAAATGTcTGCCCTATCA
AATGTCGATGGTACGTGATATGCCTACCATGTTTGAACGGGTAACGGGGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCATGAGAAACGGcTAC
CACATCCAAGGAAGGCAGCAGCGCGCAACTTACCACTCCCGGCACGGGGAGGTAGTGAcGAAAAATAACAATACGGGACTCTTCGAGGCC
CCGTAATGGGAATGAGTACACTTTAAACCCCTTTAACGAGGATCTATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCAGCTCCAATAG
CGTATATTAAGTTGTTGCAGTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCTCGGGTGACGGCGGGCGGTCCGGCTCGCGCCGGTCACTGCCCGTATTA
TCCTGCCCTACTTGTCTGCCGCTCTCTCCGCGGGTGCTCTCGCTGAGCGTCCCGGGTGGCCGGCGGTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTC
AAAGCAGGCATTACAAGCCTGAATAATGGTGCATGGAATAATGGAATAGGACCTCGGTTCTATTTTGTGGTTTCGGAACCTGGAGGTAATGA
TTAACAGGGACAACGGGGGCAATTCGATTGCGGCTTAGAGGTGAAATCTTGATCGCCGCAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGTCAAG
AATGTTTTCTATTAGTCAAGAACGAAAGTCAGAGCGCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTTCTGACCATAAACTATGCCACCTGGCCATCCGC
AGGAGTTGCTTCGATGACTCTGCGGGCGGCC-
TCCGGGAAACCAAGGTTTTGGTTCCGGGGGAAGTATGGTTGCAAAGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGA
GCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAACTCACCCGGTCCGGACACTGTAAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTCTTGATTCCGTGGGT
GGTGGTGCATGGCCGTTCTAGTTGGTGGAGCGATTGTCTGGTTAATCCGATAACGAACGAGACTCTAGCCTATTAATAGTTGCGCTCGGTG
GTTCTATTGCCGACGGCGTACACTTCTTAGAGGGACGAGTGGCGTTTAGCCACACGAAATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTC
CGGGGGCGCACGCGCGCTACACTGAAGGAATCAGCGTGGATGCCTCCCTGGCCGAAAGGGCTGGGAAACCCGTTGAATCTCCTTCGTGCTAG
GGATTGGGGCTTGAATTTGCCCATGAACGAGGAATCCACAGTAAGCGCGAGTCATAAGCTCGCGTTGATTACGTCCTCGCCCTTGTACACA
CCGCCCGTCGCTACTATCGATTGAGCGGTTCACTGAGGGCCTCGGACTGGTCTCGGTCTGGCGTGAAGCGCCGGCACCGTTGGCCGGGAAGA
CGCTCGAACTCGATCGCTTGG

>Am36

AGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTTCACACTGTTTGACGGTGAAACCGCGAATGGCTCATTAAATCAGTCGAGGTT
CCTTAGATGACACGATCCTACTTGGATAACTGTGGCAATTCTAGAGCTAATACATGCTTACCAAGCTCCGACCTTTATTGGAAGAGCGCTTTAT
TAGTCAAAACCAATCGCGCTCCTTC-----
GCGAGGGCGGTGTCCCATTTGGTGAATcTGGATAACTTTGTGCTGATCGCATGGCCTTCGTGCCGGCGACGCATCTTTCAAATGTCTGCCCTATC
AAATGTCGATGGTACGTGATATGCCTACCATGTTTGAACGGGTAACGGGGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCATGAGAAACGGcTA
CCACATCCAAGGAAGGCAGCAGCGCGCAACTTACCACTCCCGGCACGGGGAGGTAGTGACGAAAAATAACAATACGGGACTCTTCGAGGC
CCCGTAATGGGAATGAGTACACTTTAAACCCCTTTAACGAGGATCTATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCAGCTCCAATA
GCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCTCGGGTGACGGCGGGCGGTCCGGCTCGCGCCGGTCACTGCCCGTATTA
ATCCTGCCCTACTTGTCTGCCGCTCTCTCCGCGGGTGCTCTTCGCTGAGCGTCCCGGGTGGCCGGCGCGTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGT
CAAAGCAGGCATTACAAGCCTGAATAATGGTGCATGGAATAATGGAATAGGACCTCGGTTCTATTTTGTGGTTTTCGGAACCTGGAGGTAATG
ATTAACAGGGACAACCGGGGGCATTCTGATTGCGGCGTTAGAGGTGAAATCTTGATCGCCGCAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGTCAA
GAATGTTTTCTATTAGTCAAGAACGAAAGTCAGAGGCGCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTTCTGACCATAAACTATGCCACCTGGCCATCC
GCAGGAGTTGCTTCGATGACTCTGCGGGCGGCC-
TCCGGGAAACCAAGGTTTTGGTTCCGGGGGAAGTATGGTTGCAAAGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGA
GCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAACTCACCCGGTCCGGACACTGTAAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTCTTGATTCCGTGGGT
GGTGGTGCATGGCCGTTCTAGTTGGTGGAGCGATTGTCTGGTTAATCCGATAACGAACGAGACTCTAGCCTATTAATAGTTGCGCTCGGTG
GTTCTATTGCCGACGGCGTACACTTCTTAGAGGGACGAGTGGCGTTTAGCCACACGAAATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTC
CGGGGGCGCACGCGCGCTACACTGAAGGAATCAGCGTGGATGCCTCCCTGGCCGAAAGGGCTGGGAAACCCGTTGAATCTCCTTCGTGCTAG
GGATTGGGGCTTGAATTTGCCCATGAACGAGGAATCCACAGTAAGCGCGAGTCATAAGCTCGCGTTGATTACGTCCTCGCCCTTGTACACA
CCGCCCGTCGCTACTATCGATTGAGCGGTTCACTGAGGGCCTCGGACTGGTCTCGGTCTGGCGTGAAGCGCCGGCACCGTTGGCCGGGAAGA
CGCTCGAACTCGATCGCTTGG

>Am37

AGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTTCACACTGTTTGACGGTGAAACCGCGAATGGCTCATTAAATCAGTCGAGGTT
CcTTAGATGACACGATCCTACTTGGATAACTGTGGCAATTCTAGAGCTAATACATGCTTACCAAGCTCCGACCTTTATTGGAAGAGCGCTTTAT
TAGTCAAAACCAATcGCGTCCTTC-----
GCGAGGGCGGTGTCCCATTTGGTGAATcTGGATAACTTTGTGCTGATCGCATGGCCTTCGTGCCGGCGACGCATCTTTCAAATGTCTGCCCTATC
AAATGTCGATGGTACGTGATATGCCTACCATGTTTGAACGGGTAACGGGGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCATGAGAAACGGcTA
CCACATCCAAGGAAGGCAGCAGCGCGCAACTTACCACTCCCGGCACGGGGAGGTAGTGACGAAAAATAACAATACGGGACTCTTCGAGGC
CCCGTAATGGGAATGAGTACACTTTAAACCCCTTTAACGAGGATCTATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCAGCTCCAATA
GCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCTCGGGTGACGGCGGGCGGTCCGGCTCGCGCCGGTCACTGCCCGTATTA
ATCCTGCCCTACTTGTCTGCCGCTCTCTCCGCGGGTGCTCTTCGCTGAGCGTCCCGGGTGGCCGGCGCGTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGT
CAAAGCAGGCATTACAAGCCTGAATAATGGTGCATGGAATAATGGAATAGGACCTCGGTTCTATTTTGTGGTTTTCGGAACCTGGAGGTAATG
ATTAACAGGGACAACCGGGGGCATTCTGATTGCGGCGTTAGAGGTGAAATCTTGATCGCCGCAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGTCAA
GAATGTTTTCTATTAGTCAAGAACGAAAGTCAGAGGCGCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTTCTGACCATAAACTATGCCACCTGGCCATCC
CAGGAGTTGCTTCGATGACTCTGCGGGCGGCC-
TCCGGGAAACCAAGGTTTTGGTTCCGGGGGAAGTATGGTTGCAAAGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGA
GCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAACTCACCCGGTCCGGACACTGTAAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTCTTGATTCCGTGGGT
GGTGGTGCATGGCCGTTCTAGTTGGTGGAGCGATTGTCTGGTTAATCCGATAACGAACGAGACTCTAGCCTATTAATAGTTGCGCTCGGTG
GTTCTATTGCCGACGGCGTACACTTCTTAGAGGGACGAGTGGCGTTTAGCCACACGAAATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTC
CGGGGGCGCACGCGCGCTACACTGAAGGAATCAGCGTGGATGCCTCCCTGGCCGAAAGGGCTGGGAAACCCGTTGAATCTCCTTCGTGCTAG
GGATTGGGGCTTGAATTTGCCCATGAACGAGGAATCCACAGTAAGCGCGAGTCATAAGCTCGCGTTGATTACGTCCTCGCCCTTGTACACA
CCGCCCGTCGCTACTATCGATTGAGCGGTTCACTGAGGGCCTCGGACTGGTCTCGGTCTGGCGTGAAGCGCCGGCACCGTTGGCCGGGAAGA
CGCTCGAACTCGATCGCTTGG

GGATTGGGGCTTGTAAATTGTTCCCATGAACGAGGAATCCAGTAAGCGCGAGTCATAAGCTCGCGTTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACA
CCGCCCCGTCGCTACTATCGATTGAGCGGTTCACTGAGGGCCTCGGACTGGTCTCGGTCTGCGTGCAAGCGCCGGCACCGTTGGCCGGGAAGA
CGCTCGAACTCGATCGCTTGG

>Am39

AGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTTCACACTGTTTGACGGTGAAACCGCGAATGGCTCATTAAATCAGTCGAGGTT
CCTTAGATGACACGATCCTACTTGGATAACTGTGGCAATTCTAGAGCTAATACATGCTTACCAAGCTCCGACCTTTATTGAAAGAGcGcTTTTATT
AGTTCAAACCAATCGCCGTCCTTTC-----

GCGAGGGCGGTGTCCCATTTGGTGACTcTGGATAACTTTGTGCTGATCGCATGGCCTTCGTGCCGGCGACGCATCTTTCAAATGTCTGCCCTATC
AAATGTCGATGGTACGTGATATGCCTACCATGTTTGTAAACGGGTAAACGGGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCATGAGAAACGGcTA
CCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAACTTACCACTCCCGGCACGGGGAGGTAGTGAcGAAAAATAACAATACGGGACTCTTTTCGAGGC
CCCGTAattGGAATGAGTACACTTTAAACCTTTAAACGAGGATCTATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCCAGCTCCAATA
GCGTATATTAAGTTGTTGAGTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCTCGGGTGACGGCGGGCGGTCCGGCTCGCGCCGGTTCAGTCCCGTATTAA
ATCCTGCCCTAcTTGTCTGCCGGCTCTCTCCCGCGGTGCTCTTCGTGAGCGTCCCGGGTGCGCGCGCGTTCATTGAAAAAATTAGAGTGT
CAAAGCAGGCATTACAAGCCTGAATAATGGTGATGGAATAATGGAATAGGACCTCGGTTCTATTTGTTGGTTTTCCGAACTGGAGGTAATG
ATTAACAGGGGACAAACGGGGCATTCTGATTGCGGCGTTAGAGGTGAAATTCTTGGATCGCCGCAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGTCAA
GAATGTTTTATTAGTCAAGAACGAAAGTCAGAGGCGCGAAGACGATCAGATACCGTCTGATGTTCTGACCATAAACTATGCCACCTGGCCATCC
GCAGGAGTTGCTTCGATGACTCTGCGGGCGGCC-

TCCGGGAAACCAAAGTTTTGGGTTCCGGGGGAAGTATGGTTGCAAAGCTGAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGA
GCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTCACCGGTCCGGACACTGTAAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTTCTTGATTCGGTGGGT
GGTGGTGATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGCGATTGTCTGGTTAATCCGATAACGAACGAGACTCTAGCCTATTAATAGTTCGCTCGGTG
GTTCTATTGCCGACGGCTACACTCTTAGAGGGACGAGTGGCGTTTAGCCACACGAAATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTC
CGGGGCCGACGCGCTACACTGAAGGAATCAGCGTGGATGCCTCCCTGGCCGAAAGGGCTGGGAAACCCGTTGAATCTCCTTCGTGCTAG
GGATTGGGGCTTGAATTGTTCCCATGAACGAGGAATCCAGTAAGCGCGAGTCATAAGCTCGCGTTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACA
CCGCCCCGTCGCTACTATCGATTGAGCGGTTCACTGAGGGCCTCGGACTGGTCTCGGTCTGCGTGCAAGCGCCGGCACCGTTGGCCGGGAAGA
CGCTCGAACTCGATCGCTTGG

>Am40

AGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTTCACACTGTTTGACGGTGAAACCGcGAATGGCTCATTAAATCAGTCGAGGTT
CTTAGATGACACGATCCTACTTGGATAACTGTGGCAATTCTAGAGCTAATACATGCTTACCAAGCTCCGACCTTTATTGAAAGAGcGcTTTTATTA
GTTCAAACCAATCGCGTCCTTTC-----

GCGAGGGCGGTGTCCCATTTGGTGACTcTGGATAACTTTGTGCTGATCGCATGGCCTTCGTgCCGGCGACGCATCTTTCAAATGTCTGCCCTATCA
AATGTCTGATGGTACGTGATATGCCTACCATGTTTGTAAACGGGTAAACGGGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCATGAGAAACGGcTAC
CACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAACTTACCACTCCCGGCACGGGGAGGTAGTGAcGAAAAATAACAATACGGGACTCTTTTCGAGGCC
CCGTAattGGAATGAGTACACTTTAAACCTTTAAACGAGGATCTATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCCAGCTCCAATAG
CGTATATTAAGTTGTTGACGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCTCGGGTGACGGCGGGCGGTCCGGCTCGCGCCGGTTCAGTCCCGTATTAA
TCCTGCCCTACTTGTCTGCCGGCTCTCTCCCGCGGTGCTCTTCGTGAGCGTCCCGGGTGCGCGCGCGTTCATTGAAAAAATTAGAGTGTT
AAAGCAGGCATTACAAGCCTGAATAATGGTGATGGAATAATGGAATAGGACCTCGGTTCTATTTGTTGGTTTTCCGAACTGGAGGTAATGA
TTAACAGGGACAAACGGGGGCAATTCTGATTGCGGCGTTAGAGGTGAAATTCTTGGATCGCCGCAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGTCAA
AATGTTTTATTAGTCAAGAACGAAAGTCAGAGGCGCGAAGACGATCAGATACCGTCTGATGTTCTGACCATAAACTATGCCACCTGGCCATCCGC
AGGAGTTGCTTCGATGACTCTGCGGGCGGCC-

TCCGGGAAACCAAAGTTTTGGGTTCCGGGGGAAGTATGGTTGCAAAGCTGAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGA
GCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTCACCGGTCCGGACACTGTAAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTTCTTGATTCGGTGGGT
GGTGGTGATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGCGATTGTCTGGTTAATCCGATAACGAACGAGACTCTAGCCTATTAAATAGTTTCGCTCGGTG
GTTCTATTGCCGACGGCTACACTCTTAGAGGGACGAGTGGCGTTTAGCCACACGAAATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTC
CGGGGCCGACGCGCTACACTGAAGGAATCAGCGTGGATGCCTCCCTGGCCGAAAGGGCTGGGAAACCCGTTGAATCTCCTTCGTGCTAG
GGATTGGGGCTTGAATTGTTCCCATGAACGAGGAATCCAGTAAGCGCGAGTCATAAGCTCGCGTTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACA
CCGCCCCGTCGCTACTATCGATTGAGCGGTTCACTGAGGGCCTCGGACTGGTCTCGGTCTGCGTGCAAGCGCCGGCACCGTTGGCCGGGAAGA
CGCTCGAACTCGATCGCTTGG

>Am41

AGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTTCACACTGTTTGACGGTGAAACCGCGAATGGCTCATTAAATCAGTCGAGGTT
CCTTAGATGACACGATCCTACTTGGATAACTGTGGCAATTCTAGAGCTAATACATGCTTACCAAGCTCCGACCTTTATTGAAAGAGCGCTTTTAT
TAGTTCAAACCAATCGCGTCCTTTC-----

GCGAGGGCGGTGTCCCATTTGGTGACTcTGGATAACTTTGTGCTGATCGCATGGCCTTCGTGCCGGCGACGCATCTTTCAAATGTCTGCCCTATC
AAATGTCGATGGTACGTGATATGCCTACCATGTTTGTAAACGGGTAAACGGGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCATGAGAAACGGcTA
CCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAACTTACCACTCCCGGCACGGGGAGGTAGTGAcGAAAAATAACAATACGGGACTCTTTTCGAGGC
CCCGTAattGGAATGAGTACACTTTAAACCTTTAAACGAGGATCTATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCCAGCTCCAATA
GCGTATATTAAGTTGTTGAGTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCTCGGGTGACGGCGGGCGGTCCGGCTCGCGCCGGTTCAGTCCCGTATTAA
ATCCTGCCCTACTTGTCTGCCGGCTCTCTCCCGCGGTGCTCTTCGTGAGCGTCCCGGGTGCGCGCGCGTTCATTGAAAAAATTAGAGTGT
CAAAGCAGGCATTACAAGCCTGAATAATGGTGATGGAATAATGGAATAGGACCTCGGTTCTATTTGTTGGTTTTCCGAACTGGAGGTAATG
ATTAACAGGGACAAACGGGGGCAATTCTGATTGCGGCGTTAGAGGTGAAATTCTTGGATCGCCGCAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGTCAA
GAATGTTTTATTAGTCAAGAACGAAAGTCAGAGGCGCGAAGACGATCAGATACCGTCTGATGTTCTGACCATAAACTATGCCACCTGGCCATCC
GCAGGAGTTGCTTCGATGACTCTGCGGGCGGCC-

TCCGGGAAACCAAAGTTTTGGGTTCCGGGGGAAGTATGGTTGCAAAGCTGAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGA
GCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTCACCGGTCCGGACACTGTAAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTTCTTGATTCGGTGGGT
GGTGGTGATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGCGATTGTCTGGTTAATCCGATAACGAACGAGACTCTAGCCTATTAAATAGTTCGCTCGGTG
GTTCTATTGCCGACGGCTACACTCTTAGAGGGACGAGTGGCGTTTAGCCACACGAAATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTC
CGGGGCCGACGCGCTACACTGAAGGAATCAGCGTGGATGCCTCCCTGGCCGAAAGGGCTGGGAAACCCGTTGAATCTCCTTCGTGCTAG
GGATTGGGGCTTGAATTGTTCCCATGAACGAGGAATCCAGTAAGCGCGAGTCATAAGCTCGCGTTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACA

CCGCCGTCGCTACTATCGATTGAGCGGTTCACTGAGGGCCTCGGACTGGTCTCGGTCTGGCGTGCAAGCGCCGGCACC GTTGGCCGGGAAGA
CGCTCGAACTCGATCGCTTG
>Am42
AGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTTCACACTGTTTGACGGTGAAACCGCAATGGCTCATTAAATCAGTCGAGGTT
CcTTAGATGACACGATCCTACTTGGATAACTGTGGCAATTCTAGAGCTAATACATGCTTACCAAGCTCCGACCTTTATTGGAAAGAGcGcTTTTATT
AGTTCAAACCAATCgCCGTCCTTTC-----
GCGAGGGCGGTGTCCCATTGGTGACTcTGGATAACTTTGTGCTGATCGCATGGCCTTCGTGCCGGCGACGCATCTTTCAAATGTCTGCCCTATC
AAATGTGATGGTACGTGATATGCCTACCATGTTTGTAAACGGGTAACGGGGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCATGAGAAACGGcTA
CCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAACTTACCCACTCCCGGCACGGGAGGTAGTGACGAAAAATAACAATACGGGACTCTTTTCGAGGC
CCCGTAattGGAATGAGTACACTTTAAACCTTTAACGAGGATCTATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCAGCTCCAATA
GCGTATATTAAGTTGTTGCAAGTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCTCGGGTGACAGGCGGGCGGTCCGGCTCGCGCCGGTTCACTGCCCGTATTAA
ATCCTGCCCTACTTGTCTGCCGGCTCTCTCCGCGGGTGCTCTTCGCTGAGCGTCCCGGGTGCCGGCGCGTTCCTTTGAAAAAATTAGAGTGTT
CAAAGCAGGCATTACAAGCCTGAATAATGGTGCATGGAATAATGGAATAGGACCTCGGTTCTATTTTGTGGTTTTTCGGAACCTGGAGGTAATG
ATTAACAGGGACAACCGGGGCATTGCTATTGCGGCGTTAGAGGTGAAATCTTGGATCGCCGCAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTGTCAA
GAATGTTTTATTAGTCAAGAACGAAAGTCAGAGGCGCGAAGACGATCAGATACCGTCTGATGTTCTGACCATAAACTATGCCACCTGGCCATCC
GCAGGAGTTGCTTCGATGACTCTGCGGGCGGCC-
TCCGGGAAACCAAGGTTTTGGGTTCCGGGGGAAGTATGGTTGCAAAGCTGAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGA
GCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTCACCCTCCGGGACACTGTAAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTTCTTGATTCCGGTGGGT
GGTGGTGCATGGCCGTTCTAGTTGGTGGAGCGATTGTCTGGTTAATCCGATAACGAACGAGACTCTAGCCTATTAATAAGTTCGCTCGGTG
GTTCTATTGCCGACGGCGTACACTTCTAGAGGGACGAGTGGCGTTAGCCACACGAAATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTC
CGGGCCGACGCGCGCTACACTGAAGGAATCAGCGTGGATGCCTCCCTGGCCGAAAGGGCTGGGAAACCCGTTGAATCTCCTTCGTGCTAG
GGATTGGGGCTTGAATTTGTTCCCATGAACGAGGAATCCAGTAAGCGCGAGTCATAAGCTCGCGTTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACA
CCGCCGTCGCTACTATCGATTGAGCGGTTCACTGAGGGCCTCGGACTGGTCTCGGTCTGGCGTGCAAGCGCCGGCACC GTTGGCCGGGAAGA
CGCTCGAACTCGATCGCTTG
>Am43
AGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTTCACACTGTTTGACGGTGAAACCGCAATGGCTCATTAAATCAGTCGAGGTT
CcTTAGATGACACGATCCTACTTGGATAACTGTGGCAATTCTAGAGCTAATACATGCTTACCAAGCTCCGACCTTTATTGGAAAGAGcGcTTTTATT
aGTTCAAACCAATCgCCGTCCTTTC-----
GCGAGGGCGGTGTCCCATTGGTGACTcTGGATAACTTTGTGCTGATCGCATGGCCTTCGTGCCGGCGACGCATCTTTCAAATGTCTGCCCTATC
AAATGTGATGGTACGTGATATGCCTACCATGTTTGTAAACGGGTAACGGGGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCATGAGAAACGGcTA
CCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAACTTACCCACTCCCGGCACGGGAGGTAGTGAcGAAAAATAACAATACGGGACTCTTTTCGAGGC
CCCGTAattGGAATGAGTACACTTTAAACCTTTAACGAGGATCTATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCAGCTCCAATA
GCGTATATTAAGTTGTTGCAAGTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCTCGGGTGACAGGCGGGCGGTCCGGCTCGCGCCGGTTCACTGCCCGTATTAA
ATCCTGCCCTACTTGTCTGCCGGCTCTCTCCGCGGGTGCTCTTCGCTGAGCGTCCCGGGTGCCGGCGCGTTCCTTTGAAAAAATTAGAGTGTT
CAAAGCAGGCATTACAAGCCTGAATAATGGTGCATGGAATAATGGAATAGGACCTCGGTTCTATTTTGTGGTTTTTCGGAACCTGGAGGTAATG
ATTAACAGGGACAACCGGGGCATTGCTATTGCGGCGTTAGAGGTGAAATCTTGGATCGCCGCAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTGTCAA
GAATGTTTTATTAGTCAAGAACGAAAGTCAGAGGCGCGAAGACGATCAGATACCGTCTGATGTTCTGACCATAAACTATGCCACCTGGCCATCC
GCAGGAGTTGCTTCGATGACTCTGCGGGCGGCC-
TCCGGGAAACCAAGGTTTTGGGTTCCGGGGGAAGTATGGTTGCAAAGCTGAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGA
GCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTCACCCTCCGGGACACTGTAAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTTCTTGATTCCGGTGGGT
GGTGGTGCATGGCCGTTCTAGTTGGTGGAGCGATTGTCTGGTTAATCCGATAACGAACGAGACTCTAGCCTATTAATAAGTTCGCTCGGTG
GTTCTATTGCCGACGGCGTACACTTCTAGAGGGACGAGTGGCGTTAGCCACACGAAATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTC
CGGGCCGACGCGCGCTACACTGAAGGAATCAGCGTGGATGCCTCCCTGGCCGAAAGGGCTGGGAAACCCGTTGAATCTCCTTCGTGCTAG
GGATTGGGGCTTGAATTTGTTCCCATGAACGAGGAATCCAGTAAGCGCGAGTCATAAGCTCGCGTTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACA
CCGCCGTCGCTACTATCGATTGAGCGGTTCACTGAGGGCCTCGGACTGGTCTCGGTCTGGCGTGCAAGCGCCGGCACC GTTGGCCGGGAAGA
CGCTCGAACTCGATCGCTTG
>Am44
AGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTTCACACTGTTTGACGGTGAAACCGcGAATGGCTCATTAAATCAGTCGAGGTT
cTTAGATGACACGATCCTACTTGGATAACTGTGGCAATTCTAGAGCTAATACATGCTTACCAAGCTCCGACCTTTATTGGAAGAGCGCTTTTATT
aGTTCAAACCAATCgCCGTCCTTTC-----
GCGAGGGCGGTGTCCCATTGGTGACTcTGGATAACTTTGTGCTGATCGCATGGCCTTCGTGCCGGCGACGCATCTTTCAAATGTCTGCCCTATCA
AATGTGATGGTACGTGATATGCCTACCATGTTTGTAAACGGGTAACGGGGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCATGAGAAACGGcTAC
CATGCTCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAACTTACCCACTCCCGGCACGGGAGGTAGTGAcGAAAAATAACAATACGGGACTCTTTTCGAGGCC
CCGTAattGGAATGAGTACACTTTAAACCTTTAACGAGGATCTATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCAGCTCCAATAG
CGTATATTAAGTTGTTGCAAGTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCTCGGGTGACAGGCGGGCGGTCCGGCTCGCGCCGGTTCACTGCCCGTATTAAA
TCCTGCCCTACTTGTCTGCCGGCTCTCTCCGCGGGTGCTCTTCGCTGAGCGTCCCGGGTGCCGGCGCGGTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTT
AAAGCAGGCATTACAAGCCTGAATAATGGTGCATGGAATAATGGAATAGGACCTCGGTTCTATTTTGTGGTTTTTCGGAACCTGGAGGTAATGA
TTAAACAGGGACAACCGGGGCATTGCTATTGCGGCGTTAGAGGTGAAATCTTGGATCGCCGCAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTGTCAA
AATGTTTTATTAGTCAAGAACGAAAGTCAGAGGCGCGAAGACGATCAGATACCGTCTGATGTTCTGACCATAAACTATGCCACCTGGCCATCCGC
AGGAGTTGCTTCGATGACTCTGCGGGCGGCC-
TCCGGGAAACCAAGGTTTTGGGTTCCGGGGGAAGTATGGTTGCAAAGCTGAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGAG
CCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTCACCCTCCGGGACACTGTAAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTTCTTGATTCCGGTGGGT
GTGGTGCATGGCCGTTCTAGTTGGTGGAGCGATTGTCTGGTTAATCCGATAACGAACGAGACTCTAGCCTATTAATAAGTTCGCTCGGTGG
TTCTATTGCCGACGGCGTACACTTCTAGAGGGACGAGTGGCGTTAGCCACACGAAATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTC
GGGGCCGACGCGCGCTACACTGAAGGAATCAGCGTGGATGCCTCCCTGGCCGAAAGGGCTGGGAAACCCGTTGAATCTCCTTCGTGCTAGG
GATTGGGGCTTGAATTTGTTCCCATGAACGAGGAATCCAGTAAGCGCGAGTCATAAGCTCGCGTTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACAC
CGCCGTCGCTACTATCGATTGAGCGGTTCACTGAGGGCCTCGGACTGGTCTCGGTCTGGCGTGCAAGCGCCGGCACC GTTGGCCGGGAAGAC
GCTCGAACTCGATCGCTTG

>80

AGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTTCACACTGTTTGACGGTGAAACCGCGAATGGCTCATTAAATCAGTCGAGGTT
 CCTTAGATGACACGATCCTACTTGGATAACTGTGGCAATTCTAGAGCTAATACATGCTTACCAAGCTCCGACCTTTATTGGAAGAGCGCTTTTAT
 TAGTTCAAACCAATCGCCGCCATTCTTCACTTGCCTGGTGGTCCGCTCCCATTTGGTGACTCTGGATAACTTTGTGCTGATCGCATGGCCTTCGT
 GCCGGCGACGCATCTTTCAAATGTCTGCCCTATCAAATGTCGATGGTAGCTGATATGCCTACCATGTTTGTAAACGGGTAACGGGGAATCAGGGTT
 CGATTCCGGAGAGGGAGCATGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAACTTACCACTCCCGGCACGGGGAGGTAGTG
 ACGAAAAATAACAATACGGGACTCTTTCGAGGCCCGTAATTGGAATGAGTACACTTTAAACCTTTAACGAGGATCTATTGGAGGGCAAGTCT
 GGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTGTGTGACAGTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCTCGGGTGCAGGCGGGC
 GGTCCGGCTCGCGCGGTTCACTGCCGTATTAATCCTGCCCTACTGTCTGCCGGCTCTCTCCGCGGGTGCTCTTCGCTGAGCGTCCCGGGTG
 GCCGGCGCGTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCATTACAAGCCTGAATAATGGTGCATGGAATAATGGAATAGGACCTCGGT
 TCTATTTTGTGGTTTTCGGAACCTGGAGGTAATGATTAACAGGGACAAACGGGGGCAATTCGATTGCGGCGTTAGAGGTGAAATTTCTGGATCG
 CCGCAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGTCAAGAATGTTTTATTAGTCAAGAACGAAAGTCAGAGGCGCGAAGACGATCAGATACCGTCGT
 AGTTCTGACCATAACTATGCCACCTGGCCATCCGACGAGGTGCTTCGATGACTCTGCGGGCGGCTCCGGGAAACCAAGGTTTTGGGTTC
 GGGGGAAGTATGGTTGCAAGCTGAAACTTAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACGAGGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGG
 GAAAACTCACCCGGTCCGGACACTGTAAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTTCTTGATTGCGTGGTGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTG
 GAGCGATTGTCTGGTTAATTCGATAACGAACGAGACTCTAGCTATTAATAGTTGCGCTCGGTGGTTCTATTGCCGACGGCGTACACTTCTTA
 GAGGGACGAGTGGCGTTTAGCCACACGAAATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCCGGGGCCGACGCGCGCTACACTGAAG
 GAATCAGCGTGGATGCTCCCTGGCCGAAAGGGCTGGGAAACCGGTTGAATCTCTTCGTGCTAGGGATTGGGGCTTGAATTTGTTCCCATG
 AACGAGGAATCCAGTAAGCGCGAGTCATAAGCTCGCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCGTCGCTACTATCGATTGAGCGG
 TTCAGTGAGGGCCTCGACTGGTCTCGGTCTGGCTGCAAGCGCCGCCACCGTTGGCCGGGAAGACGCTCGAACTCGATCGCT

>96

AGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTTCACACTGTTTGACGGTGAAACCGCGAATGGCTCATTAAATCAGTCGAGGTT
 CCTTAGATGACACGATCCTACTTGGATAACTGTGGCAATTCTAGAGCTAATACATGCTTACCAAGCTCCGACCTTTATTGGAAGAGCGCTTTTAT
 TAGTTCAAACCAATCGCCGCTTTTCGCGAGGGCGGTGTCCCATTTGGTGACTCTGGATAACTTTGTGCTGATCGCATGGCCTTCGTGCCGGCG
 ACGCATCTTTCAAATGTCTGCCCTATCAAATGTCGATGGTAGCTGATATGCCTACCATGTTTGTAAACGGGTAACGGGGAATCAGGGTTGATTCC
 GGAGAGGGAGCATGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAACTTACCACTCCCGGCACGGGGAGGTAGTGACGAAAA
 ATAACAATACGGGACTCTTTCGAGGCCCGTAATTGGAATGAGTACACTTTAAACCTTTAACGAGGATCTATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAG
 CAGCCGCGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTGTGTGACAGTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCTCGGGTGCAGGCGGGCGGTCCGGC
 TCGCGCCGTTCACTGCCGTATTAATCCTGCCCTACTGTCTGCCGGCTCTCTCCGCGGGTGCTCTTCGCTGAGCGTCCCGGGTGGCCGGCGC
 GTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCATTACAAGCCTGAATAATGGTGCATGGAATAATGGAATAGGACCTCGGTCTATTTTG
 TTGGTTTTCGGAACTGGAGGTAATGATTAACAGGGACAAACGGGGCATTCTGATTGCGGCGTTAGAGGTGAAATTTCTGGATCGCCGCAAGAC
 GAACTACTGCGAAAGCATTTGTCAAGAATGTTTTATTAGTCAAGAACGAAAGTCAGAGGCGCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTTCTGAC
 CATAAACTATGCCACCTGGCCATCCGACGAGTTGCTTCGATGACTCTGCGGGCGGCTCCGGGAAACCAAGGTTTTGGTTCCGGGGGAAGT
 ATGGTTGCAAAGCTGAACTTAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACGAGGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTCA
 CCCGGTCCGGACACTGTAAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTTCTTGATTGCGTGGTGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTAGTTGGTGAGCGATT
 GTCTGGTTAATTCGATAACGAACGAGACTCTAGCTATTAATAGTTGCGCTCGGTGGTTCTATTGCCGACGGCGTACACTTCTTAGAGGGACG
 AGTGCGGTTTAGCCACACGAAATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCCGGGGCCGACGCGCGCTACACTGAAGGAATCAGCG
 TGGATGCTCCCTGGCCGAAAGGGCTGGGAAACCGGTTGAATCTCTTCGTGCTAGGGATTGGGGCTTGAATTTGTTCCCATGAACGAGGAA
 TTCCAGTAAGCGCGAGTCATAAGCTCGCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCGTCGCTACTATCGATTGAGCGGTTCACTGAG
 GGCTCGGACTGGTCTCGGTCTGGCGTGCAAGCGCCGGCACCGTTGGCCGGGAAGACGCTCGAACTCGATCGCT

>104

AGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTTCACACTGTTTGACGGTGAAACCGCGAATGGCTCATTAAATCAGTCGAGGTT
 CCTTAGATGACACGATCCTACTTGGATAACTGTGGCAATTCTAGAGCTAATACATGCTTACCAAGCTCCGACCTTTATTGGAAGAGCGCTTTTAT
 TAGTTCAAACCAATCGCCGCTTTTCGCGAGGGCGGTGTCCCATTTGGTGACTCTGGATAACTTTGTGCTGATCGCATGGCCTTCGTGCCGGCG
 ACGCATCTTTCAAATGTCTGCCCTATCAAATGTCGATGGTAGCTGATATGCCTACCATGTTTGTAAACGGGTAACGGGGAATCAGGGTTGATTCC
 GGAGAGGGAGCATGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAACTTACCACTCCCGGCACGGGGAGGTAGTGACGAAAA
 ATAACAATACGGGACTCTTTCGAGGCCCGTAATTGGAATGAGTACACTTTAAACCTTTAACGAGGATCTATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAG
 CAGCCGCGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTGTGTGACAGTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCTCGGGTGCAGGCGGGCGGTCCGGC
 TCGCGCCGTTCACTGCCGTATTAATCCTGCCCTACTGTCTGCCGGCTCTCTCCGCGGGTGCTCTTCGCTGAGCGTCCCGGGTGGCCGGCGC
 GTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCATTACAAGCCTGAATAATGGTGCATGGAATAATGGAATAGGACCTCGGTCTATTTTG
 TTGGTTTTCGGAACCTGGAGGTAATGATTAACAGGGACAAACGGGGGCAATTCGATTGCGGCGTTAGAGGTGAAATTTCTGGATCGCCGCAAGAC
 GAACTACTGCGAAAGCATTTGTCAAGAATGTTTTATTAGTCAAGAACGAAAGTCAGAGGCGCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTTCTGAC
 CATAAACTATGCCACCTGGCCATCCGACGAGTTGCTTCGATGACTCTGCGGGCGGCTCCGGGAAACCAAGGTTTTGGTTCCGGGGGAAGT
 ATGGTTGCAAAGCTGAACTTAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACGAGGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTCA
 CCCGGTCCGGACACTGTAAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTTCTTGATTGCGTGGTGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTAGTTGGTGAGCGATT
 GTCTGGTTAATTCGATAACGAACGAGACTCTAGCTATTAATAGTTGCGCTCGGTGGTTCTATTGCCGACGGCGTACACTTCTTAGAGGGACG
 AGTGCGGTTTAGCCACACGAAATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCCGGGGCCGACGCGCGCTACACTGAAGGAATCAGCG
 TGGATGCTCCCTGGCCGAAAGGGCTGGGAAACCGGTTGAATCTCTTCGTGCTAGGGATTGGGGCTTGAATTTGTTCCCATGAACGAGGAA
 TTCCAGTAAGCGCGAGTCATAAGCTCGCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCGTCGCTACTATCGATTGAGCGGTTCACTGAG
 GGCTCGGACTGGTCTCGGTCTGGCGTGCAAGCGCCGGCACCGTTGGCCGGGAAGACGCTCGAACTCGATCGCT

Anexo 4 - Sequências nucleotídicas da região *ITS-2* do *mtDNA*

>81

TTGCCACAAAGCAATCGTGTCTTGCAGCTCTACTTGCAAAAACCGAAGCCCTGCTCTGGCGATGGTTGGATACGCCCTGGACCCTCGCGGCCAA
AGCCATCGCTGCCTTGCTTGCTTGCTGCTCGGCGGCGATGGTGAAGGCCCGTGGTCTTAAGCGCAAGCCGCGCCGTTGTCGGTTCATCTTGTA
ACGTCTTCGACGCTGCCCTGCTTGGCGGCTGTCCGTTTTCTACCGCCAGGCAGGACCCGGCTCGTAACCTGCGTTCTCGGGCCTGCAGTC
CATGGCGTTGCGGCTCGTGGGTGGAGAACAAAGGGGCTGGCTTTAATAAGTCATTTCGAGGACATCGTTACTTGGTCGGCGCCTGTCGTTGAATGA
AACTGATAATTTTTATATTTAACTAAATATTGGTTATCAGATTCTTTTTCTCCGACCTCAGATCGGACGAGATTACCCG

>82

CGTCCGTCTGAGGGTCGGTTTGCCACAAAGCAATCGTGTCTTGCAGCTCTACTTGCAAAAACCGAAGCCCTGCTCTGGCGATGGTTGGATACGC
CCTGGACCCTCGCGGCCAAAGCCATCGCTGCCTTGCTTGCTTGCTGCTCGGCGGCGATGGTGAAGGCCCGTGGTCTTAAGCGCAAGCCGCGC
CGTTGTCGGTTCATCTTGTAACGTCTTCGACGCTGCCCTGCTTGGCGGCTGTCCGTTTTCTACCGCCAGGCAGGACCCGGCTCGCTAACTT
GCGTTCTCGGGCCTGCAGTCCATGGCGTTGCGGCTCGTGGGTGGAGAACAAAGGGGCTGGCTTTAATAAGTCATTTCGAGGACATCGTTACTTGGT
CGGCGCCTGTCGTTGAATGAACTGATAATTTTTATATTTAACTAAATATTGGTTATCAGATTCTTTTTCTCCGACCTCAGATCGGACGAGAT
TACCCGC

>2

GTTTGCCACAAAGCATTCTGTCTTGCAGCTCTCGCAAAAACCGAAGCCTTGGCGGTGAGCTCTACGCTGCTCGGCGATGGTTGGATACGCC
CTGGACCCTCGCGGCCAAAGCTGTGCTTGCTGCTCGGCGGCGACGGTGACGGCCCCGTGGTCTTAAGCGCAAGCCGCGCCGTTGTCGGTTCAT
CTCGTAACGTCTTCGACGCTGCCCTGCTTGGCGGCTGTCCGTTTTCTACCGCCAGGCAGGACCCGGCTCGCTACTTTATTTATTATCGTGG
CGTTCTCGGGCCTGCAGTCCATGGCATCGCAGCTCGTGGGTGGAGAACAAAGGGGCTCTAAGACGCTACGTGGTCGGCGCCCGTCTGTTGAATGA
AACATTATTTGTTTCTTTCTCCGACCTCAGATCGGACGAGATTACCCGCTGAACTTAAGCAA

>3

GGTTTGCCACAAAGCATTCTGTCTTGCAGCTCTCGCAAAAACCGAAGCCTTGGCGGTGAGCTCTACGCTGCTCGGCGATGGTTGGATACGC
CCTGGACCCTCGCGGCCAAAGCTGTGCTTGCTGCTCGGCGGCGACGGTGACGGCCCCGTGGTCTTAAGCGCAAGCCGCGCCGTTGTCGGTTCAT
TCTCGTAACGTCTTCGACGCTGCCCTGCTTGGCGGCTGTCCGTTTTCTACCGCCAGGCAGGACCCGGCTCGCTACTTTATTTATTATCGTG
GCGTTCTCGGGCCTGCAGTCCATGGCATCGCAGCTCGTGGGTGGAGAACAAAGGGGCTCTAAGACGCTACGTGGTCGGCGCCCGTCTGTTGAATG
AAACATTATTTGTTTCTTTCTCCGACCTCAGATCGGACGAGATTACCCGCTGAACTTAAGCAA

>12

AATCTCGTCCGTCTGAGGGTCGGTTTGCCACAAAGCAATCGTGTCTTGCAGCTCTACTTGCAAAAACCGAAGCCCTGCTCTGGCGATGGTTGGA
TAGCCCTGGACCCTCGCGGCCAAAGCCATCGCTGCCTTGCTTGCTTGCTTGCTGCTCGGCGGCGATGGTGAAGGCCCGTGGTCTTAAG
CGCAAGCCGCGCCGTTGTCGGTTCATCTTGTAACGTCTTCGACGCTGCCCTGCTTGGCGGCTGTCCGTTTTCTACCGCCAGGCAGGACCCG
GCTCGCTAACTTGCCTTTCGGGCTGCAGTCCATGGCGTTGCGGCTCGTGGGTGGAGAACAAAGGGGCTGGCTTTAATAAGTCATTTCGAGGACA
TCGTTACTTGGTCGGCGCCTGCTGTTGAATGAACTGATAATTTTTATATTTAGTTATATTAGTTATCAGA

>13

GTCCGTCTGAGGGTCGGTTTGCCACAAAGCAATCGTGTCTTGCAGCTCTACTTGCAAAAACCGAAGCCCTGCTCTGGCGATGGTTGGATACGCC
CTGGACCCTCGCGGCCAAAGCCATCGCTGCCTTGCTTGCTTGCTTGCTTGCTGCTCGGCGGCGATGGTGAAGGCCCGTGGTCTTAAGCGCAAG
CCGCGCCGTTGTCGGTTCATCTTGTAACGTCTTCGACGCTGCCCTGCTTGGCGGCTGTCCGTTTTCTACCGCCAGGCAGGACCCGGCTCGC
TAACTTGCCTTTCGGGCTGCAGTCCATGGCGTTGCGGCTCGTGGGTGGAGAACAAAGGGGCTGGCTTTAATAAGTCATTTCGAGGACATCGTTA
CTTGGTCGGCGCCTGCTGTTGAATGAACTGATAATTTTTATATTTAGTTATATTAGTTATCAGATTCTTTTTCTCCGACCTCAGATCGGACGA
GATTACCCGC

>53

GTTACGCGGTAATCCGTCCGTCTGAGGGTCGGTTTGCCACAAAGCATTCTGTCTTGCAGCTCTCGCAAAAACCGAAGCCTTGGCGGTGAG
CTCTACGCTGCTCGGCGATGGTTGGATACGCCCTGGACCCTCGCGGCCAAAGCTGTGCTTGCTGCTGCTGCTCGGCGGCGACGGTGACGGCCCCGTGG
TCTTAAGCGCAAGCCGCGCCGTTGTCGGTTCATCTCGTAACGTCTTCGACGCTGCCCTGCTTGGCGGCTGTCCGTTTTCTACCGCCAGGCAGGCA
GGACCCGGCTCGCTACTTTATTTATTATCGTGGCGTTCTCGGGCTGCAGTCCATGGCATCGCAGCTCGTGGGTGGAGAACAAAGGGGCTCTAA
GACGCTACGTGGTCGGCGCCCGTCTGTTGAATGAAACATTATTTGTTTCTTTCTCCGACCTCAGATCGGACGAGATTACCCGCTGAACTTAAGCAA

>54

GTCCGTCTGAGGGTCGGTTTGCCACAAAGCATTCTGTCTTGCAGCTCTCGCAAAAACCGAAGCCTTGGCGGTGAGCTCTACGCTGCTCGGC
GATGGTTGGATACGCCCTGGACCCTCGCGGCCAAAGCTGTGCTTGCTGCTGCTGCTCGGCGGCGACGGTGACGGCCCCGTGGTCTTAAGCGCAAGCCG
CGCCGTTGTCGGTTCATCTCGTAACGTCTTCGACGCTGCCCTGCTTGGCGGCTGTCCGTTTTCTACCGCCAGGCAGGACCCGGCTCGTTA
CTTTATTTATTATCGTGGCGTTCTCGGGCTGCAGTCCATGGCATCGCAGCTCGTGGGTGGAGAACAAAGGGGCTCTAAGACGCTACGTGGTCGG
CGCCGCTGTTGAATGAAACATTATTTGTTTCTTTCTCCGACCTCAGATCGGACGAGATTACCCGCTGAACTTAGGCAA

Anexo 5 - Sequências nucleotídicas do gene *16S* do *mtDNA*

>LSP1

TTTATTAGCGGCCGAGTACTTTGACTGTGCTAAGGTAGCATAATCAATTGGCTTTAATTGTAGTCTGGAATGAAAGGACTAATAGGGGTAGC
TGTCTCTATACTATTTTGAATTTATTTAAGTGAATACTTATACAAAGAAAAAGACGAGAAGACCCTTAGAATTTTAAATAATTTA
ATAATTTTTTTTGTGGGGCGACATTGAAACAATTAACCTTTCATTA
ACAATCAAGACATTTAGGTTTGAAAGAATAAATTACCTTAGGGATAACAGCATAATTAATTTAGTTTGTGACCTCGATGTTGGACTAGGAACT
AGAAGATTAAACGCTAAATAGATTGTTCTGTTCAACAGAAATTCCTACGTGATCTGAGTTTCAGACCGG

>LSP2

TTTATTAGCGGCCGCGAGTACTTTGACTGTGCTAAGGTAGCATAATCAATTGGCTTTTAAATTGTAGTCTGGAATGAAAGGACTAATAGGGGTTAGC
 TGTCTCTATACTATTATTTGAATTTATTTATTAAGTGAAAATACTTATACAAAGAAAAAGACGAGAAGACCCTTAGAATTTTAAATAAAATATTTA
 ATAATTTTTTTTTGTTGGGGCGACATTGAAACAATTAACCTTTCATTA
 ACAATCAAGACATTTAGGTTTGAAAGAATAAATTACCTTAGGGATAACAGCATAATTAATTATTTAGTTTGTGACCTCGATGTTGGACTAGGAACT
 AGAAGATTAACCGTCTAAATAGATTGTTCTGTTGCAACAGAAATTCCTACGTGATCTGAGTTCAGACCGG
 >LSP3
 TTTATTAGCGGCCGCGAGTACTTTGACTGTGCTAAGGTAGCATAATCAATTGGCTTTTAAATTGTAGTCTGGAATGAAAGGACTAATAGGGGTTAGC
 TGTCTCTATACTATTATTTGAATTTATTTATTAAGTGAAAATACTTATACAAAGAAAAAGACGAGAAGACCCTTAGAATTTTAAATAAAATATTTA
 ATAATTTTTTTTTGTTGGGGCGACATTGAAACAATTAACCTTTCATTA
 ACAATCAAGACATTTAGGTTTGAAAGAATAAATTACCTTAGGGATAACAGCATAATTAATTATTTAGTTTGTGACCTCGATGTTGGACTAGGAACT
 AGAAGATTAACCGTCTAAATAGATTGTTCTGTTGCAACAGAAATTCCTACGTGATCTGAGTTCAGACCGG
 >LSP6
 TTTATTAGCGGCCGCGAGTACTTTGACTGTGCTAAGGTAGCATAATCAATTGGCTTTTAAATTGTAGTCTGGAATGAAAGGACTAATAGGGGTTAGC
 TGTCTCTATACTATTATTTGAATTTATTTATTAAGTGAAAATACTTATACAAAGAAAAAGACGAGAAGACCCTTAGAATTTTAAATAAAATATTTA
 ATAATTTTTTTTTGTTGGGGCGACATTGAAACAATTAACCTTTCATTA
 ACAATCAAGACATTTAGGTTTGAAAGAATAAATTACCTTAGGGATAACAGCATAATTAATTATTTAGTTTGTGACCTCGATGTTGGACTAGGAACT
 AGAAGATTAACCGTCTAAATAGATTGTTCTGTTGCAACAGAAATTCCTACGTGATCTGAGTTCAGACCGG
 >LSP7
 TTTATTAGCGGCCGCGAGTACTTTGACTGTGCTAAGGTAGCATAATCAATTGGCTTTTAAATTGTAGTCTGGAATGAAAGGACTAATAGGGGTTAGC
 TGTCTCTATACTATTATTTGAATTTATTTATTAAGTGAAAATACTTATACAAAGAAAAAGACGAGAAGACCCTTAGAATTTTAAATAAAATATTTA
 ATAATTTTTTTTTGTTGGGGCGACATTGAAACAATTAACCTTTCATTA
 ACAATCAAGACATTTAGGTTTGAAAGAATAAATTACCTTAGGGATAACAGCATAATTAATTATTTAGTTTGTGACCTCGATGTTGGACTAGGAACT
 AGAAGATTAACCGTCTAAATAGATTGTTCTGTTGCAACAGAAATTCCTACGTGATCTGAGTTCAGACCGG
 >LSP8
 TTTATTAGCGGCCGCGAGTACTTTGACTGTGCTAAGGTAGCATAATCAATTGGCTTTTAAATTGTAGTCTGGAATGAAAGGACTAATAGGGGTTAGC
 TGTCTCTATACTATTATTTGAATTTATTTATTAAGTGAAAATACTTATACAAAGAAAAAGACGAGAAGACCCTTAGAATTTTAAATAAAATATTTA
 ATAATTTTTTTTTGTTGGGGCGACATTGAAACAATTAACCTTTCATTA
 ACAATCAAGACATTTAGGTTTGAAAGAATAAATTACCTTAGGGATAACAGCATAATTAATTATTTAGTTTGTGACCTCGATGTTGGACTAGGAACT
 AGAAGATTAACCGTCTAAATAGATTGTTCTGTTGCAACAGAAATTCCTACGTGATCTGAGTTCAGACCGG
 >LN9
 ATTCTGCCAGCGTAAAAAATTAGCGGCCGCGAGTACCTTGACTGTGCTAAGGTAGCATAATCAATTGGCTTTTAAATTGAAGTCTGGAATGAAAGG
 TATAATAAAGAATTTCTGTCTCTTTGGATTTTATTGAACCTATTTATTAAGTGAAAATACTTTAACTTAGAAAAAGACGAGAAGACCCTAAGA
 ATTTTAAATAAATTTATGTAAATTTATTTTTTTGTTGGGGCGACAT
 TTAAACATTTTAACTTTATTTATATACATGACATTGAAGTTTGTAAAGTTAAATTACCTTAGGGATAACAGCATAATAATTTAAATAGCTTATGAC
 CTCGATGTTGGACTAGGAACTAAAAGACTAACCGTCAAAATAGATTGTTCTGTTGCAACATAATACTCCTACGTGATCTGAGTTCAGACCGGA
 >LN10
 ATTCTGCCAGCGTAAAAAATTAGCGGCCGCGAGTACCTTGACTGTGCTAAGGTAGCATAATCAATTGGCTTTTAAATTGAAGTCTGGAATGAAAGG
 TATAATAAAGAATTTCTGTCTCTTTGGATTTTATTGAACCTATTTATTAAGTGAAAATACTTTAACTTAGAAAAAGACGAGAAGACCCTAAGA
 ATTTTAAATAAATTTATGTAAATTTATTTTTTTGTTGGGGCGACATTTAAACATTTTAACTTTATTTATATACATGACATTGAAGTTTGTAAAGA
 TTAAATTACCTTAGGGATAACAGCATAATAATTTAAATAGCTTATGACCTCGATGTTGGACTAGGAACTAA
 AAGACTAACCGTCAAAATAGATTGTTCTGTTGCAACATAATACTCCTACGTGATCTGAGGTCAGACCGGA
 >Lt4
 ATATTAGCGGCCGCGAGTACCTTGACTGTGCTAAGGTAGCATAATCAGTTGGCTTTTAAATTGAAGTCTGGAATGAACGGGTTAATGGGGACTTGCT
 GTCTCTTAATAATTATTTGAATTTATTTATTAAGTGAAAATACTTATTTAGAAAAAGACGAGAAGACCCTTAGAATTTTAAATAAAATATTAT
 TAATATTATTTTTTTGTTGGGGCGACAATGAAACACTTAACTTTCTT
 TATTTATGACATTAAGGTTTGAAAGAATAAATTACCTTAGGGATAACAGCATAATTAATAAATTAGTTTGTGACCTCGATGTTGGACTAGGAACT
 AGTTGACTAACAGTCAAAATAGATTGTTCTGTTGCAACAGAAATTCCTACGTGATCTGAGTTCAGACCGGA
 >Lt5
 ATATTAGCGGCCGCGAGTACCTTGACTGTGCTAAGGTAGCATAATCAATTGGCTTTTAAATTGAAGTCTGGAATGAACGGATTAATGGGGACTTGCT
 GTCTCTTAATAATTACTTTGAAATTATTTATTAAGTGAAAATACTTATAATTAGAAAAAGACGAGAAGACCCTTAGAATTTTAAATAAAACATAA
 ATAAATGTTATTTTTTTGTTGGGGCGACATTGAAACAATAAACTTTCTTTATTTATGACATTAAGGTTTGAAAGAGTAAATTACCTTAGGGATA
 ACAGCATAATTAATAAATTAGTTGACCTCGATGTTGGACTAGGAACTAGTGTGACTAGCAGTCAAAATAGA
 TTGTTCTGTTGCAACGGAAATTCCTACGTGATCTGAGTTCAGACCGGA

Anexo 6 - Sequências nucleotídicas do gene *COI* do *mtDNA*

>LSP11
 ATGTGGTTTAGTTGGAACAGGTTTGTCTTATTAATTCGTTTAGAATTAGGTACATCTATAGTTTAAATTGACGAGCATTTTTATAATGTAATTGTT
 ACTGCTCATGCTTTTGTATAATTTTTTCATAGTTATACCAATAATAATTGGAGGGTTTGAAATTGAATAGTTCACCTTCTCATTGGTGCTCCAG
 ATATAAGATTCTCGTATAAATAATATAAGATTTTGATTACTACCACCTTCGTTTATCTCTTACTTTGCTCTAGAATAGTAGAAGGTGGGGTAGG
 TACTGGATGAACAGTTTACCCACCATGAGTGGACCTATTGCTCATGGTGGATCTTCTGTTGATTTAGCTATTTTTCTTACATTTAGCCGTTTAT
 CCAGGATTTTAGGAGCAATTAATTTTACTACAATTTTAAATACGATCTCCAGGTATTACATTAGAACGAATAAGATTATTTGTATG
 ATCTGTATTAGTTACAGCTTTTTACTTCTTTATCTTTACCAGTACTTGAGGGCAATTACAATGCTTTTAAACAGATCGAAATTTTAAATACCACTT
 TTTTGTATCCTGCTGGAGGTGGTATCCTATTTTATATCAACATTTATTCTGATTTTTTGGTCAACCCGAAGTTTAA
 >LSP12

ATGTGGTTAGTTGGAACAGGTTTGCCTTATTAATTCGTTTGAATTAGGTACATCTATAGTTTAAATTGACGAGCATTTTATAATGTAATTGTT
 ACTGCTCATGCTTTTGTATAAATTTTTTCATAGTTATACCAATAATAAATTGGAGGGTTTGGAAATTGAATAGTCCACTTCTCATTGGTGCTCCAG
 ATATAAGATTTCTCGTATAAATAATATAAGATTTTGATTACTACCACCTTCGTTTATCTCTTACTTTGCTCTAGAATAGTAGAAGGTGGGGTAGG
 TACTGGATGAACAGTTTACCCACCATTGAGTGGACCTATTGCTCATGGTGGATCTTCTGTTGATTAGCTATTTTTCTTACATTTAGCCGGTTTAT
 CCAGGATTTTAGGAGCAATTAATTTTATTACTACAATTTTAAATATACGATCTCCAGGTATTACATTAGAACGAATAAGATTATTTGTATG
 ATCTGTATTAGTTACAGCTTTTTACTTCTTTATCTTTACCAGTACTGCAGGGGCAATTACAATGCTTTTAAACAGATCGAAATTTTAAATACCACTT
 TTTTGATCCTGCTGGAGGTGGTGATCCTATTTTATATCAACATTTATTCTGATTTTTTGGTCACCCNAAAGTTTAA

>LSP13

ATGTGGTTAGTTGGAACAGGTTTGCCTTATTAATTCGTTTGAATTAGGTACATCTATAGTTTAAATTGACGAGCATTTTATAATGTAATTGTT
 ACTGCTCATGCTTTTGTATAAATTTTTTCATAGTTATACCAATAATAAATTGGAGGGTTTGGAAATTGAATAGTCCACTTCTCATTGGTGCTCCAG
 ATATAAGATTTCTCGTATAAATAATATAAGATTTTGATTACTACCACCTTCGTTTATCTCTTACTTTGCTCTAGAATAGTAGAAGGTGGGGTAGG
 TACTGGATGAACAGTTTACCCACCATTGAGTGGACCTATTGCTCATGGTGGATCTTCTGTTGATTAGCTATTTTTCTTACATTTAGCCGGTTTAT
 CCAGGATTTTAGGAGCAATTAATTTTATTACTACAATTTTAAATATACGATCTCCAGGTATTACATTAGAACGAATAAGATTATTTGTATGATCTGT
 ATTAGTTACAGCTTTTTACTTCTTTATCTTTACCAGTACTGCAGGGGCAATTACAATGCTTTTAAACAGATCGAAATTTTAAATACCACTTTTTTG
 ATCCTGCTGGAGGTGGTGATCCTATTTTATATCAACATTTATTCTGATTTTTTGGTAANCCGAAAAGTTTAA

>LSP16

ATGTGGTTAGTTGGAACAGGTTTGCCTTATTAATTCGTTTGAATTAGGTACATCTATAGTTTAAATTGACGAGCATTTTATAATGTAATTGTT
 ACTGCTCATGCTTTTGTATAAATTTTTTCATAGTTATACCAATAATAAATTGGAGGGTTTGGAAATTGAATAGTCCACTTCTCATTGGTGCTCCAG
 ATATAAGATTTCTCGTATAAATAATATAAGATTTTGATTACTACCACCTTCGTTTATCTCTTACTTTGCTCTAGAATAGTAGAAGGTGGGGTAGG
 TACTGGATGAACAGTTTACCCACCATTGAGTGGACCTATTGCTCATGGTGGATCTTCTGTTGATTAGCTATTTTTCTTACATTTAGCCGGTTTAT
 CCAGGATTTTAGGAGCAATTAATTTTATTACTACAATTTTAAATATACGATCTCCAGGTATTACATTAGAACGAATAAGATTATTTGTATG
 ATCTGTATTAGTTACAGCTTTTTACTTCTTTATCTTTACCAGTACTGCAGGGGCAATTACAATGCTTTTAAACAGATCGAAATTTTAAATACCACTT
 TTTTGATCCTGCTGGAGGTGGTGATCCTATTTTATATCAACATTTATTCTGATTTTTTGGTCACCCNAAAGTTTAA

>LSP17

ATGTGGTTAGTTGGAACAGGTTTGCCTTATTAATTCGTTTGAATTAGGTACATCTATAGTTTAAATTGACGAGCATTTTATAATGTAATTGTT
 ACTGCTCATGCTTTTGTATAAATTTTTTCATAGTTATACCAATAATAAATTGGAGGGTTTGGAAATTGAATAGTCCACTTCTCATTGGTGCTCCAG
 ATATAAGATTTCTCGTATAAATAATATAAGATTTTGATTACTACCACCTTCGTTTATCTCTTACTTTGCTCTAGAATAGTAGAAGGTGGGGTAGG
 TACTGGATGAACAGTTTACCCACCATTGAGTGGACCTATTGCTCATGGTGGATCTTCTGTTGATTAGCTATTTTTCTTACATTTAGCCGGTTTAT
 CCAGGATTTTAGGAGCAATTAATTTTATTACTACAATTTTAAATATACGATCTCCAGGTATTACATTAGAACGAATAAGATTATTTGTATG
 ATCTGTATTAGTTACAGCTTTTTACTTCTTTATCTTTACCAGTACTGCAGGGGCAATTACAATGCTTTTAAACAGATCGAAATTTTAAATACCACTT
 TTTTGATCCTGCTGGAGGTGGTGATCCTATTTTATATCAACATTTATTCTGATTTTTTGGTCACCCGAAAAGTTTAA

>LSP18

ATGTGGTTAGTTGGAACAGGTTTGCCTTATTAATTCGTTTGAATTAGGTACATCTATAGTTTAAATTGACGAGCATTTTATAATGTAATTGTT
 ACTGCTCATGCTTTTGTATAAATTTTTTCATAGTTATACCAATAATAAATTGGAGGGTTTGGAAATTGAATAGTCCACTTCTCATTGGTGCTCCAG
 ATATAAGATTTCTCGTATAAATAATATAAGATTTTGATTACTACCACCTTCGTTTATCTCTTACTTTGCTCTAGAATAGTAGAAGGTGGGGTAGG
 TACTGGATGAACAGTTTACCCACCATTGAGTGGACCTATTGCTCATGGTGGATCTTCTGTTGATTAGCTATTTTTCTTACATTTAGCCGGTTTAT
 CCAGGATTTTAGGAGCAATTAATTTTATTACTACAATTTTAAATATACGATCTCCAGGTATTACATTAGAACGAATAAGATTATTTGTATGATCTGT
 ATTAGTTACAGCTTTTTACTTCTTTATCTTTACCAGTACTGCAGGGGCAATTACAATGCTTTTAAACAGATCGAAATTTTAAATACCACTTTTTTG
 ATCCTGCTGGAGGTGGTGATCCTATTTTATATCAACATTTATTCTGATTTTTTGGTCACCCGAAAAGTTTAA

>LN19

GGGTTATCACTACTAATCCGGTTGGAATTAGGAACCTTCATAGTACTTATTGATGAGCATTTTTATAATGTAATTGTTACAGCCCATGCTTTTGTTA
 TAATTTTTTTTATAGTTAATACCAATAATAAATTGGTGGATTTCGGAATTGAATGGTTCCATTATTAATTGGTGCTCTGATATAAGTTTTCCACGTAT
 AAATAATATAAGATTTTGATTGTTACCACCTTCTTTGTTCTTCTTTGCTCAAGTATGGTAGAGGGTGGAGTTGGTACTGGATGAACAGTTTAT
 CCACCTTTAAGAGGGCCAATTGCTCATGGTGGTCTTCAGTTGACTTAGCTATTTTTCTCTTCAATTGGCAGGGTTATCAAGAATCTTAGGTGCTA
 TTAATTTTCATTACGACAATTTTAAATATGCGATCTCCAGGAATCACCTTAGAACGAATAAGTTTATTTGTTGATCAGTATTAATTAAGTCA
 TTCTTGTTATTAATCTTTACCTGTATTGGCAGGTGCTATTACTATACTACTAAGTATGATCGAAATTTTAAATACTACTTCTTTGATCCTGCCGGAGG
 TGGTGATCCTATTCTTTATCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCGAAAAGTTTAA

>LN20

GGGTTATCACTACTAATCCGGTTGGAATTAGGAACCTTCATAGTACTTATTGATGAGCATTTTTATAATGTAATTGTTACAGCCCATGCTTTTGTTA
 TAATTTTTTTTATAGTTAATACCAATAATAAATTGGTGGATTTCGGAATTGAATGGTTCCATTATTAATTGGTGCTCTGATATAAGTTTTCCACGTAT
 AAATAATATAAGATTTTGATTGTTACCACCTTCTTTGTTCTTCTTTGCTCAAGTATGGTAGAGGGTGGAGTTGGTACTGGATGAACAGTTTAT
 CCACCTTTAAGAGGGCCAATTGCTCATGGTGGTCTTCAGTTGACTTGGCTATTTTTCTCTTCAATTGGCAGGGTTATCAAGAATCTTAGGTGCTA
 TTAATTTTCATTACGACAATTTTAAATATGCGATCTCCAGGAATCACCTTAGAACGAATAAGTTTATTTGTTGATCAGTATTAATTAAGTCA
 TTCTTGTTATTAATCTTTACCTGTATTGGCAGGTGCTATTACTATACTACTAAGTATGATCGAAATTTTAAATACTACTTCTTTGATCCTGCCGGAGG
 TGGTGATCCTATTCTTTATCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCGAAAAGTTTAA

>lt14

CGGTTTATCCTTACTAATTCGATTAGAACTAGGTACATCTACAGTTTAAATTGATGAACATTTCTATAATGTAATTGTTACAGCACATGCTTTTGTTA
 TAATTTTTTTTATAGTTAATACCAATAATAAATTGGAGGGTTTGGAAATTGAATAGTACCTTTATTGATTGGTGCTCTGATATAAGATTCCCACGAAT
 GAATAATATAAGATTTTGATTACTGCCTCCATCTTTTATTCTCTTTTATGTTCAAGTATAGTTGAAGGAGGAGTTGGTACAGGTTGAACGTGTTTAT
 CCTCTTTAAGAGGACCTATTGCTCATGGTGGATCCTCAGTTGATTAGCTATTTTTCTTACATTTAGCTGGTCTCTAGAATTTTAGGTGCTAT
 TAATTTTATTACTACGATTTTAAATATACGCTCTCCAGGTATTACTTTAGAACGAATAAGATTATTTGATGATCTGTGTTAGTTACAGC
 TTTTTTATTACTTTTATCTTTACCTGTATTAGCTGGTGGTATTACTATGCTTCTACAGATCGAAATTTTAAATACTTCTTTTTTATGATCAGCTGGTGG
 AGGTGACCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCGAAAAGTTTAA

>lt15

TGGTTTATCTTTATTAATTCGATTGGAGTTAAGAACATCTACGGTTTAAATTGATGAACATTTCTATAATGTAATTGTTACAGCACATGCAATTTGTT
 ATAATTTTTTTATAGTAATACCTATAATAAATTGGTGGATTGGTAATTGAATAGTGCCTTTATTGATTGGTGCTCCTGATATAAGATTCCCACGA
 TAAATAATATAAGGTTTTGATTACTTCTCCATCTTTTATTCTTCTTTATGTTCAAGCATAGTTGAAGGGGGAGTGGGTACAGGTTGAACAGTTTAA

CCCACCTTTAAGCGGACCTATTGCCCATGGCGGGTCTTCAGTTGACTAGCTATTTTTCTCTACATTTAGCAGGTCTTTCTAGTATTTTAGGTGCT
 ATTAATTTTATTACTACAATTTTCAATATACGATCGCCCGGAATTACTTTAGAACGAATAAGGTTATTTGTGTGATCTGTTTTAGTTACTGC
 TTTTCTTTTACTTTTATCTTTACCTGTATTAGCTGGAGCAATTACTATGCTTTTAACAGATCGAAATTTCAATACCTCTTTTTTATGATCCAGCCGGGG
 GTGGTGACCCTATTTTATATCAACATTTATTTTGATTTTTGGTACACCAAAAGTTAA

Anexo 7 - Modelos de substituição para Análise filogenética do gene *18S* do *rDNA*

Find Best-Fit Substitution Model (ML)

Page 1 of 1

Table. Maximum Likelihood fits of 24 different nucleotide substitution models

Model	Parameters	BIC	AICc	lnL	(+I)	(+G)	R	f(A)	f(T)	f(C)	f(G)	r(AT)	r(AC)	r(AG)	r(TA)	r(TC)	r(TG)	r(CA)	r(CT)	r(CG)
JC+G	98	6821.334	5902.487	-2853.133	n/a	0.05	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
JC	97	6825.870	5916.397	-2861.090	n/a	n/a	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
K2+G	99	6827.995	5899.775	-2850.774	n/a	0.05	0.90	0.250	0.250	0.250	0.250	0.066	0.066	0.118	0.066	0.118	0.066	0.066	0.118	0.066
JC+G+I	99	6828.891	5900.671	-2851.222	0.81	0.60	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
K2	98	6832.606	5913.760	-2858.769	n/a	n/a	0.87	0.250	0.250	0.250	0.250	0.067	0.067	0.116	0.067	0.116	0.067	0.067	0.116	0.067
K2+G+I	100	6835.281	5897.687	-2848.728	0.81	0.61	0.98	0.250	0.250	0.250	0.250	0.063	0.063	0.124	0.063	0.124	0.063	0.063	0.124	0.063
JC+I	98	6837.122	5918.276	-2861.027	0.01	n/a	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
T92+G	100	6837.189	5899.595	-2849.682	n/a	0.05	0.90	0.243	0.243	0.257	0.257	0.064	0.068	0.122	0.064	0.122	0.068	0.064	0.115	0.068
T92	99	6841.840	5913.620	-2857.696	n/a	n/a	0.87	0.243	0.243	0.257	0.257	0.065	0.069	0.120	0.065	0.120	0.069	0.065	0.113	0.065
K2+I	99	6843.900	5915.680	-2858.727	0.01	n/a	0.87	0.250	0.250	0.250	0.250	0.067	0.067	0.116	0.067	0.116	0.067	0.067	0.116	0.067
T92+G+I	101	6844.390	5897.423	-2847.593	0.82	0.61	0.98	0.243	0.243	0.257	0.257	0.061	0.065	0.128	0.061	0.128	0.065	0.061	0.120	0.065
T92+I	100	6852.994	5915.400	-2857.584	0.02	n/a	0.87	0.243	0.243	0.257	0.257	0.065	0.069	0.120	0.065	0.120	0.069	0.065	0.113	0.065
HKY+G	102	6855.016	5898.675	-2847.217	n/a	0.05	0.90	0.238	0.247	0.236	0.278	0.065	0.062	0.132	0.063	0.112	0.073	0.063	0.117	0.073
HKY	101	6859.799	5912.831	-2855.298	n/a	n/a	0.87	0.238	0.247	0.236	0.278	0.066	0.063	0.130	0.064	0.110	0.074	0.064	0.115	0.074
HKY+G+I	103	6861.906	5896.191	-2844.973	0.82	0.60	1.00	0.238	0.247	0.236	0.278	0.062	0.059	0.140	0.059	0.118	0.069	0.059	0.124	0.065
TN93+G	103	6862.299	5896.585	-2845.170	n/a	0.05	0.92	0.238	0.247	0.236	0.278	0.064	0.061	0.084	0.062	0.160	0.072	0.062	0.167	0.072
TN93	102	6866.856	5910.515	-2853.137	n/a	n/a	0.88	0.238	0.247	0.236	0.278	0.065	0.063	0.084	0.063	0.154	0.074	0.063	0.161	0.074
TN93+G+I	104	6870.466	5895.378	-2843.564	0.51	0.05	0.99	0.238	0.247	0.236	0.278	0.062	0.059	0.086	0.059	0.167	0.069	0.059	0.174	0.065
HKY+I	102	6871.026	5914.686	-2855.222	0.01	n/a	0.87	0.238	0.247	0.236	0.278	0.066	0.063	0.130	0.064	0.110	0.074	0.064	0.115	0.074
TN93+I	103	6878.021	5912.307	-2853.031	0.02	n/a	0.88	0.238	0.247	0.236	0.278	0.065	0.063	0.084	0.063	0.154	0.074	0.063	0.161	0.074
GTR+G	106	6894.573	5900.739	-2844.239	n/a	0.05	0.94	0.238	0.247	0.236	0.278	0.032	0.074	0.085	0.031	0.162	0.083	0.074	0.169	0.077
GTR	105	6898.986	5914.524	-2852.135	n/a	n/a	0.90	0.238	0.247	0.236	0.278	0.035	0.073	0.085	0.033	0.156	0.085	0.073	0.163	0.080
GTR+G+I	107	6905.903	5902.695	-2844.215	0.01	0.05	0.94	0.238	0.247	0.236	0.278	0.032	0.074	0.085	0.031	0.162	0.083	0.074	0.169	0.077
GTR+I	106	6910.300	5916.465	-2852.103	0.01	n/a	0.90	0.238	0.247	0.236	0.278	0.035	0.073	0.085	0.033	0.156	0.085	0.073	0.163	0.080

NOTE.— Models with the lowest BIC scores (Bayesian Information Criterion) are considered to describe the substitution pattern the best. For each model, AICc value (Akaike Information Criterion, corrected), Maximum Likelihood value (lnL), and the number of parameters (including branch lengths) are also presented [1]. Non-uniformity of evolutionary rates among sites may be modeled by using a discrete Gamma distribution (+G) with 5 rate categories and by assuming that a certain fraction of sites are evolutionarily invariable (+I). Whenever applicable, estimates of gamma shape parameter and/or the estimated fraction of invariant sites are shown. Assumed or estimated values of transition/transversion bias (R) are shown for each model, as well. They are followed by nucleotide frequencies (f) and rates of base substitutions (r) for each nucleotide pair. Relative values of instantaneous r should be considered when evaluating them. For simplicity, sum of r values is made equal to 1 for each model. For estimating ML values, a tree topology was automatically computed. The analysis involved 50 nucleotide sequences. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There were a total of 1748 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA5 [2].

Abbreviations: GTR: General Time Reversible; HKY: Hasegawa-Kishino-Yano; TN93: Tamura-Nei; T92: Tamura 3-parameter; K2: Kimura 2-parameter; JC: Jukes-Cantor.

1. Nei M. and Kumar S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.

2. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* (In Press).

Disclaimer: Although utmost care has been taken to ensure the correctness of the caption, the caption text is provided "as is" without any warranty of any kind. Authors advise the user to carefully check the caption prior to its use for any purpose and report any errors or problems to the authors immediately (www.megasoftware.net). In no event shall the authors and their employers be liable for any damages, including but not limited to special, consequential, or other damages. Authors specifically disclaim all other warranties expressed or implied, including but not limited to the determination of suitability of this caption text for a specific purpose, use, or application.

Lymnaea truncatula em Portugal: contribuição para o estudo da bioecologia e da variação genética.

Anexo 8 - Modelos de substituição para Análise filogenética da região ITS-2 do rDNA

Find Best-Fit Substitution Model (ML)

Page 1 of 1

Table. Maximum Likelihood fits of 24 different nucleotide substitution models

Model	Parameters	BIC	AICc	lnL	(+I)	(+G)	R	f(A)	f(T)	f(C)	f(G)	r(AT)	r(AC)	r(AG)	r(TA)	r(TC)	r(TG)	r(CA)	r(CT)	r(CG)
K2	62	2216.564	1761.432	-818.375	n/a	n/a	1.43	0.250	0.250	0.250	0.250	0.051	0.051	0.147	0.051	0.147	0.051	0.051	0.147	0.051
T92	63	2217.456	1754.994	-814.145	n/a	n/a	1.44	0.205	0.205	0.295	0.295	0.041	0.059	0.177	0.041	0.177	0.059	0.041	0.122	0.051
K2+I	63	2221.581	1759.119	-816.207	0.59	n/a	1.59	0.250	0.250	0.250	0.250	0.048	0.048	0.154	0.048	0.154	0.048	0.048	0.154	0.048
K2+G	63	2221.704	1759.242	-816.269	n/a	0.41	1.60	0.250	0.250	0.250	0.250	0.048	0.048	0.154	0.048	0.154	0.048	0.048	0.154	0.048
JC	61	2223.525	1775.723	-826.532	n/a	n/a	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
T92+G	64	2223.621	1753.830	-812.552	n/a	0.55	1.55	0.205	0.205	0.295	0.295	0.039	0.057	0.182	0.039	0.182	0.057	0.039	0.126	0.051
T92+I	64	2225.602	1755.810	-813.542	0.16	n/a	1.45	0.205	0.205	0.295	0.295	0.041	0.059	0.177	0.041	0.177	0.059	0.041	0.123	0.051
HKY	65	2226.951	1749.830	-809.541	n/a	n/a	1.44	0.153	0.257	0.304	0.287	0.052	0.062	0.170	0.031	0.180	0.059	0.031	0.152	0.051
JC+G	62	2229.535	1774.403	-824.861	n/a	0.55	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
JC+I	62	2230.644	1775.512	-825.415	0.29	n/a	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
K2+G+I	64	2230.934	1761.143	-816.208	0.59	200.00	1.60	0.250	0.250	0.250	0.250	0.048	0.048	0.154	0.048	0.154	0.048	0.048	0.154	0.048
HKY+G	66	2232.370	1747.921	-807.575	n/a	0.51	1.57	0.153	0.257	0.304	0.287	0.050	0.059	0.176	0.029	0.186	0.056	0.029	0.157	0.051
T92+G+I	65	2232.858	1755.737	-812.494	0.53	200.00	1.55	0.205	0.205	0.295	0.295	0.039	0.057	0.182	0.039	0.182	0.057	0.039	0.126	0.051
HKY+I	66	2233.024	1748.575	-807.901	0.38	n/a	1.49	0.153	0.257	0.304	0.287	0.051	0.060	0.173	0.030	0.183	0.057	0.030	0.154	0.051
TN93	66	2235.154	1750.705	-808.966	n/a	n/a	1.44	0.153	0.257	0.304	0.287	0.051	0.061	0.199	0.031	0.160	0.058	0.031	0.135	0.051
JC+G+I	63	2238.805	1776.343	-824.820	0.53	200.00	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
TN93+I	67	2241.048	1749.270	-807.237	0.54	n/a	1.56	0.153	0.257	0.304	0.287	0.049	0.058	0.206	0.029	0.164	0.055	0.029	0.138	0.051
TN93+G	67	2241.184	1749.407	-807.305	n/a	0.53	1.56	0.153	0.257	0.304	0.287	0.049	0.058	0.206	0.029	0.164	0.055	0.029	0.138	0.051
HKY+G+I	67	2241.586	1749.809	-807.506	0.55	200.00	1.56	0.153	0.257	0.304	0.287	0.050	0.059	0.176	0.030	0.186	0.056	0.030	0.157	0.051
GTR	69	2242.926	1736.492	-798.824	n/a	n/a	1.42	0.153	0.257	0.304	0.287	0.130	0.074	0.186	0.077	0.150	0.059	0.037	0.127	0.051
GTR+I	70	2249.621	1735.861	-797.496	0.48	n/a	1.50	0.153	0.257	0.304	0.287	0.130	0.073	0.193	0.077	0.152	0.055	0.037	0.128	0.051
GTR+G	70	2249.958	1736.197	-797.665	n/a	0.69	1.50	0.153	0.257	0.304	0.287	0.130	0.073	0.193	0.078	0.152	0.055	0.036	0.129	0.051
TN93+G+I	68	2250.400	1751.294	-807.237	0.54	200.00	1.56	0.153	0.257	0.304	0.287	0.049	0.058	0.206	0.029	0.164	0.055	0.029	0.138	0.051
GTR+G+I	71	2259.061	1737.973	-797.540	0.48	200.00	1.50	0.153	0.257	0.304	0.287	0.130	0.073	0.193	0.077	0.152	0.055	0.037	0.128	0.051

NOTE.— Models with the lowest BIC scores (Bayesian Information Criterion) are considered to describe the substitution pattern the best. For each model, AICc value (Akaike Information Criterion, corrected), Maximum Likelihood value (lnL), and the number of parameters (including branch lengths) are also presented [1]. Non-uniformity of evolutionary rates among sites may be modeled by using a discrete Gamma distribution (+G) with 5 rate categories and by assuming that a certain fraction of sites are evolutionarily invariable (+I). Whenever applicable, estimates of gamma shape parameter and/or the estimated fraction of invariant sites are shown. Assumed or estimated values of transition/transversion bias (R) are shown for each model, as well. They are followed by nucleotide frequencies (f) and rates of base substitutions (r) for each nucleotide pair. Relative values of instantaneous r should be considered when evaluating them. For simplicity, sum of r values is made equal to 1 for each model. For estimating ML values, a tree topology was automatically computed. The analysis involved 32 nucleotide sequences. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There were a total of 360 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA5 [2].

Abbreviations: GTR: General Time Reversible; HKY: Hasegawa-Kishino-Yano; TN93: Tamura-Nei; T92: Tamura 3-parameter; K2: Kimura 2-parameter; JC: Jukes-Cantor.

1. Nei M. and Kumar S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.

2. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* (In Press).

Disclaimer: Although utmost care has been taken to ensure the correctness of the caption, the caption text is provided "as is" without any warranty of any kind. Authors advise the user to carefully check the caption prior to its use for any purpose and report any errors or problems to the authors immediately (www.megasoftware.net). In no event shall the authors and their employers be liable for any damages, including but not limited to special, consequential, or other damages. Authors specifically disclaim all other warranties expressed or implied, including but not limited to the determination of suitability of this caption text for a specific purpose, use, or application.

Anexo 9 - Modelos de substituição para Análise filogenética do gene *16S* do *mtDNA*

Find Best-Fit Substitution Model (ML)

Page 1 of 1

Table. Maximum Likelihood fits of 24 different nucleotide substitution models

Model	Parameters	BIC	AICc	lnL	(+I)	(+G)	R	f(A)	f(T)	f(C)	f(G)	r(AT)	r(AC)	r(AG)	r(TA)	r(TC)	r(TG)	r(CA)	r(CT)	r(CG)
T92+G	30	2023.522	1828.319	-883.973	n/a	0.19	0.61	0.351	0.351	0.149	0.149	0.101	0.043	0.063	0.101	0.063	0.043	0.101	0.148	0.043
T92+I	30	2024.999	1829.797	-884.712	0.70	n/a	0.61	0.351	0.351	0.149	0.149	0.102	0.043	0.063	0.102	0.063	0.043	0.102	0.147	0.043
GTR+G	36	2029.089	1794.934	-861.199	n/a	0.19	0.52	0.351	0.350	0.116	0.182	0.242	0.011	0.078	0.243	0.055	0.000	0.034	0.166	0.012
GTR+I	36	2030.254	1796.099	-861.782	0.69	n/a	0.53	0.351	0.350	0.116	0.182	0.238	0.013	0.082	0.238	0.053	0.000	0.039	0.160	0.012
T92+G+I	31	2031.277	1829.580	-883.591	0.47	0.59	0.63	0.351	0.351	0.149	0.149	0.100	0.043	0.064	0.100	0.064	0.043	0.100	0.150	0.043
HKY+G	32	2036.797	1828.607	-882.092	n/a	0.19	0.62	0.351	0.350	0.116	0.182	0.101	0.034	0.077	0.101	0.049	0.053	0.101	0.148	0.053
GTR+G+I	37	2037.367	1796.722	-861.078	0.40	0.48	0.52	0.351	0.350	0.116	0.182	0.244	0.011	0.077	0.244	0.056	0.000	0.032	0.169	0.012
HKY+I	32	2038.174	1829.984	-882.780	0.70	n/a	0.61	0.351	0.350	0.116	0.182	0.101	0.034	0.077	0.101	0.049	0.053	0.101	0.148	0.053
HKY+G+I	33	2044.616	1829.934	-881.742	0.47	0.59	0.63	0.351	0.350	0.116	0.182	0.100	0.033	0.078	0.100	0.050	0.052	0.100	0.150	0.052
TN93+G	33	2045.316	1830.634	-882.091	n/a	0.19	0.62	0.351	0.350	0.116	0.182	0.101	0.034	0.077	0.101	0.049	0.053	0.101	0.149	0.053
TN93+I	33	2046.691	1832.008	-882.779	0.70	n/a	0.61	0.351	0.350	0.116	0.182	0.101	0.034	0.078	0.102	0.048	0.053	0.102	0.146	0.053
TN93+G+I	34	2053.136	1831.961	-881.742	0.47	0.59	0.63	0.351	0.350	0.116	0.182	0.100	0.033	0.078	0.100	0.050	0.052	0.100	0.150	0.052
T92	29	2054.869	1866.161	-903.906	n/a	n/a	0.52	0.351	0.351	0.149	0.149	0.108	0.046	0.057	0.108	0.057	0.046	0.108	0.135	0.046
GTR	35	2062.422	1834.757	-882.125	n/a	n/a	0.54	0.351	0.350	0.116	0.182	0.221	0.016	0.083	0.221	0.051	0.006	0.049	0.154	0.017
HKY	31	2068.019	1866.322	-901.962	n/a	n/a	0.52	0.351	0.350	0.116	0.182	0.108	0.036	0.070	0.108	0.045	0.056	0.108	0.134	0.056
TN93	32	2076.533	1868.343	-901.959	n/a	n/a	0.52	0.351	0.350	0.116	0.182	0.108	0.036	0.071	0.108	0.044	0.056	0.108	0.132	0.056
JC+G	28	2106.486	1924.275	-933.974	n/a	0.22	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
JC+G+I	29	2114.701	1925.994	-933.822	0.39	0.55	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
K2+G	29	2114.884	1926.177	-933.914	n/a	0.22	0.55	0.250	0.250	0.250	0.250	0.081	0.081	0.088	0.081	0.088	0.081	0.081	0.088	0.081
K2+I	29	2116.123	1927.416	-934.533	0.69	n/a	0.55	0.250	0.250	0.250	0.250	0.081	0.081	0.089	0.081	0.089	0.081	0.081	0.089	0.081
JC+I	28	2118.044	1935.832	-939.753	0.45	n/a	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
K2+G+I	30	2123.089	1927.887	-933.757	0.39	0.56	0.55	0.250	0.250	0.250	0.250	0.081	0.081	0.089	0.081	0.089	0.081	0.081	0.089	0.081
JC	27	2132.580	1956.865	-951.281	n/a	n/a	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
K2	28	2141.067	1958.856	-951.265	n/a	n/a	0.52	0.250	0.250	0.250	0.250	0.082	0.082	0.086	0.082	0.086	0.082	0.082	0.086	0.082

NOTE.— Models with the lowest BIC scores (Bayesian Information Criterion) are considered to describe the substitution pattern the best. For each model, AICc value (Akaike Information Criterion, corrected), Maximum Likelihood value (lnL), and the number of parameters (including branch lengths) are also presented [1]. Non-uniformity of evolutionary rates among sites may be modeled by using a discrete Gamma distribution (+G) with 5 rate categories and by assuming that a certain fraction of sites are evolutionarily invariable (+I). Whenever applicable, estimates of gamma shape parameter and/or the estimated fraction of invariant sites are shown. Assumed or estimated values of transition/transversion bias (R) are shown for each model, as well. They are followed by nucleotide frequencies (f) and rates of base substitutions (r) for each nucleotide pair. Relative values of instantaneous r should be considered when evaluating them. For simplicity, sum of r values is made equal to 1 for each model. For estimating ML values, a tree topology was automatically computed. The analysis involved 15 nucleotide sequences. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There were a total of 334 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA5 [2].

Abbreviations: GTR: General Time Reversible; HKY: Hasegawa-Kishino-Yano; TN93: Tamura-Nei; T92: Tamura 3-parameter; K2: Kimura 2-parameter; JC: Jukes-Cantor.

1. Nei M. and Kumar S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.

2. Tamura K., Peterson D., Stecher G., Nei M., and Kumar S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* (In Press).

Disclaimer: Although utmost care has been taken to ensure the correctness of the caption, the caption text is provided "as is" without any warranty of any kind. Authors advise the user to carefully check the caption prior to its use for any purpose and report any errors or problems to the authors immediately (www.megasoftware.net). In no event shall the authors and their employers be liable for any damages, including but not limited to special, consequential, or other damages. Authors specifically disclaim all other warranties expressed or implied, including but not limited to the determination of suitability of this caption text for a specific purpose, use, or application.

Lymnaea truncatula em Portugal: contribuição para o estudo da bioecologia e da variação genética.

Anexo 10 - Modelos de substituição para Análise filogenética do gene *COI* do *mtDNA*

Find Best-Fit Substitution Model (ML)

Page 1 of 1

Table. Maximum Likelihood fits of 24 different nucleotide substitution models

Model	Parameters	BIC	AICc	lnL	(+I)	(+G)	R	f(A)	f(T)	f(C)	f(G)	r(AT)	r(AC)	r(AG)	r(TA)	r(TC)	r(TG)	r(CA)	r(CT)	r(CG)
HKY+I	42	3913,698	3604,943	-1760,315	0,68	n/a	2,34	0,266	0,415	0,148	0,171	0,056	0,020	0,125	0,036	0,108	0,023	0,036	0,302	0,000
T92+I	40	3917,929	3623,862	-1771,789	0,69	n/a	2,51	0,340	0,340	0,160	0,160	0,044	0,021	0,119	0,044	0,119	0,021	0,044	0,253	0,000
HKY+G	42	3920,341	3611,586	-1763,637	n/a	0,18	2,44	0,266	0,415	0,148	0,171	0,055	0,020	0,126	0,035	0,109	0,023	0,035	0,306	0,000
TN93+I	43	3922,001	3605,902	-1759,787	0,68	n/a	2,39	0,266	0,415	0,148	0,171	0,056	0,020	0,104	0,036	0,123	0,023	0,036	0,343	0,000
HKY+G+I	43	3923,084	3606,985	-1760,329	0,68	200,00	2,35	0,266	0,415	0,148	0,171	0,056	0,020	0,125	0,036	0,108	0,023	0,036	0,302	0,000
T92+G	40	3923,406	3629,339	-1774,528	n/a	0,16	2,68	0,340	0,340	0,160	0,160	0,042	0,020	0,121	0,042	0,121	0,020	0,042	0,257	0,000
T92+G+I	41	3927,309	3625,898	-1771,800	0,69	200,00	2,52	0,340	0,340	0,160	0,160	0,044	0,021	0,119	0,044	0,119	0,021	0,044	0,253	0,000
TN93+G	43	3929,250	3613,151	-1763,412	n/a	0,18	2,46	0,266	0,415	0,148	0,171	0,054	0,019	0,112	0,035	0,119	0,022	0,035	0,333	0,000
TN93+G+I	44	3931,379	3607,936	-1759,797	0,68	200,00	2,39	0,266	0,415	0,148	0,171	0,055	0,020	0,104	0,036	0,123	0,023	0,036	0,343	0,000
GTR+I	46	3931,400	3593,272	-1750,449	0,65	n/a	2,06	0,266	0,415	0,148	0,171	0,113	0,009	0,106	0,073	0,123	0,013	0,016	0,343	0,000
GTR+G	46	3937,084	3598,955	-1753,290	n/a	0,24	1,96	0,266	0,415	0,148	0,171	0,120	0,008	0,114	0,077	0,116	0,013	0,014	0,324	0,000
GTR+G+I	47	3946,443	3600,971	-1753,290	0,00	0,24	1,96	0,266	0,415	0,148	0,171	0,120	0,008	0,114	0,077	0,116	0,013	0,014	0,324	0,000
GTR	45	4003,533	3672,747	-1791,194	n/a	n/a	1,29	0,266	0,415	0,148	0,171	0,161	0,014	0,108	0,103	0,096	0,015	0,024	0,268	0,000
HKY	41	4015,680	3714,269	-1815,985	n/a	n/a	1,32	0,266	0,415	0,148	0,171	0,082	0,030	0,103	0,053	0,089	0,034	0,053	0,250	0,000
TN93	42	4024,990	3716,234	-1815,961	n/a	n/a	1,32	0,266	0,415	0,148	0,171	0,083	0,030	0,101	0,053	0,091	0,034	0,053	0,254	0,000
T92	39	4025,640	3738,919	-1830,324	n/a	n/a	1,31	0,340	0,340	0,160	0,160	0,068	0,032	0,096	0,068	0,096	0,032	0,068	0,205	0,000
K2+I	39	4063,157	3776,435	-1849,083	0,62	n/a	1,49	0,250	0,250	0,250	0,250	0,050	0,050	0,150	0,050	0,150	0,050	0,050	0,150	0,000
K2+G	39	4065,557	3778,835	-1850,282	n/a	0,30	1,52	0,250	0,250	0,250	0,250	0,050	0,050	0,151	0,050	0,151	0,050	0,050	0,151	0,000
K2+G+I	40	4072,531	3778,465	-1849,091	0,62	200,00	1,49	0,250	0,250	0,250	0,250	0,050	0,050	0,150	0,050	0,150	0,050	0,050	0,150	0,000
JC+G	38	4105,577	3826,201	-1874,972	n/a	0,34	0,50	0,250	0,250	0,250	0,250	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083	0,000
JC+G+I	39	4112,073	3825,351	-1873,541	0,60	200,00	0,50	0,250	0,250	0,250	0,250	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083	0,000
JC+I	38	4113,595	3834,219	-1878,981	0,45	n/a	0,50	0,250	0,250	0,250	0,250	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083	0,000
K2	38	4121,769	3842,393	-1883,068	n/a	n/a	1,29	0,250	0,250	0,250	0,250	0,055	0,055	0,141	0,055	0,141	0,055	0,055	0,141	0,000
JC	37	4155,543	3883,512	-1904,634	n/a	n/a	0,50	0,250	0,250	0,250	0,250	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083	0,000

NOTE.— Models with the lowest BIC scores (Bayesian Information Criterion) are considered to describe the substitution pattern the best. For each model, AICc value (Akaike Information Criterion, corrected), Maximum Likelihood value (lnL), and the number of parameters (including branch lengths) are also presented [1]. Non-uniformity of evolutionary rates among sites may be modeled by using a discrete Gamma distribution (+G) with 5 rate categories and by assuming that a certain fraction of sites are evolutionarily invariable (+I). Whenever applicable, estimates of gamma shape parameter and/or the estimated fraction of invariant sites are shown. Assumed or estimated values of transition/transversion bias (R) are shown for each model, as well. They are followed by nucleotide frequencies (f) and rates of base substitutions (r) for each nucleotide pair. Relative values of instantaneous r should be considered when evaluating them. For simplicity, sum of r values is made equal to 1 for each model. For estimating ML values, a tree topology was automatically computed. The analysis involved 20 nucleotide sequences. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There were a total of 580 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA5 [2].

Abbreviations: GTR: General Time Reversible; HKY: Hasegawa-Kishino-Yano; TN93: Tamura-Nei; T92: Tamura 3-parameter; K2: Kimura 2-parameter; JC: Jukes-Cantor.

1. Nei M. and Kumar S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.

2. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* (In Press).

Disclaimer: Although utmost care has been taken to ensure the correctness of the caption, the caption text is provided "as is" without any warranty of any kind. Authors advise the user to carefully check the caption prior to its use for any purpose and report any errors or problems to the authors immediately (www.megasoftware.net). In no event shall the authors and their employers be liable for any damages, including but not limited to special, consequential, or other damages. Authors specifically disclaim all other warranties expressed or implied, including but not limited to the determination of suitability of this caption text for a specific purpose, use, or application.

